



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Composició de l'alga *Ulva ohnoi*: efectes de les condicions de cultiu

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Josep Ferrer Garcia

Tutor: Patrícia Jiménez

Íngrid Masaló

24 / Setembre / 2016

Resum

El cultiu de macroalgues ha anat augmentant notablement en els últims anys. Aquestes tenen moltes aplicacions de les quals en aquest treball ens hem centrat en el seu ús com a biofiltre en un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada (AMTI). Les algues incorporen els nutrients dissolts a l'aigua, d'aquesta manera es redueix el cost de la depuració d'aigües de les instal·lacions aqüícoles. Hem utilitzat algues de l'espècie *Ulva ohnoi*, el sistema constava de 3 tancs per les macroalgues i dos tancs pels llenguados.

Es van cultivar les algues a tres densitats diferents (0.8 Kg/m^2 , 1 Kg/m^2 , 1.2 Kg/m^2) durant set setmanes amb una il·luminació igual i constant als tres tancs. Els objectius eren veure si la densitat de cultiu en la qual es cultiven les algues influïa en la composició nutricional d'aquestes. Els tres tancs d'algues estaven en les mateixes condicions de cultiu menys la densitat. Setmanalment s'agafaven mostres i se'ls hi feia un anàlisi de matèria seca, matèria mineral, fòsfor, nitrogen (proteïna) i nitrogen nítric per a veure si hi havia diferències en la seva composició. En funció de la densitat de cultiu, es disposava també de les taxes de creixement ($\% \text{ dia}^{-1}$), es va estudiar la relació entre el creixement i la variació en la composició de l'alga. Es va poder observar que a més densitat de cultiu, menor era la taxa de creixement i major el contingut en nitrogen total de les macroalgues. Pel que fa al contingut en nitrogen nítric no s'ha observat acumulació al llarg del temps.

Resumen

El cultivo de macroalgas ha ido aumentando notablemente en los últimos años. Estas tienen muchas aplicaciones de las cuales en este trabajo nos centraremos en su uso como biofiltro en un sistema de acuicultura multitrofica integrada (AMTI). Las algas incorporan los nutrientes disueltos en el agua, de esta manera se reduce el coste de depuración de las aguas de las instalaciones acuícolas. Hemos utilizado algas de la especie *Ulva ohnoi*, el sistema constaba de tres tanques para las macroalgas y dos para los lenguados.

Se cultivaron las algas a tres densidades diferentes (0.8 Kg/m^2 , 1 Kg/m^2 , 1.2 Kg/m^2) durante siete semanas con una iluminación igual y constante en los tres tanques. Los objetivos eran ver si la densidad de la biomasa a la cual se cultivaban las algas influía en la composición nutricional de estas. Los tres tanques de algas estaban a las mismas condiciones de cultivo menos la densidad. Semanalmente se recogían muestras i se les hacía un análisis de materia seca, materia mineral, fósforo, nitrógeno (proteína) i nitrógeno nítrico para ver si había diferencias en su composición. En función de la densidad de cultivo, se disponía también de las tasas específicas de crecimiento ($\% \text{ día}^{-1}$), se estudió la relación entre el crecimiento i la variación en la composición de la alga. Se pudo observar que a más densidad, menor era la tasa de crecimiento i mayor el contenido en nitrógeno total de las macroalgas. En relación al contenido de nitrógeno nítrico se observó acumulación a lo largo del tiempo.

Abstract

The cultivation of seaweed has increased markedly in recent years. These seaweeds have many applications in which this work we have focused on its use as a biofilter on an integrated multitrophic aquaculture system (IMTA). Seaweeds uptake nutrients dissolved in water, thereby reducing the cost of wastewater from aquaculture facilities. We used seaweed species *Ulva ohnoi*, the system consisted of three tanks for seaweed and two tanks for flatfish.

Seaweeds had been grown on three different densities (0.8 Kg/m², 1 Kg/m², 1.2 Kg/m²) for seven weeks with an equal and constant lighting in the three tanks. The objectives were to see if the biomass density in which the seaweeds are grown influences the nutritional composition of these. The three tanks of seaweeds were in the same culture conditions less density. Weekly samples were collected and then made an analysis of dry matter, mineral matter, phosphorous, nitrogen (protein) and nitric nitrogen to see if there were any differences in their composition. According to the cultivation density, we also had growth rates (%day⁻¹), we studied the relationship between growth and changes in the composition of the seaweeds. It was observed that in a higher density, the growth rate was lower and the total nitrogen content of seaweeds was higher. Regarding the content of nitrate nitrogen, accumulation has not been observed during all the time.

Sumari

ÍNDEX DE FIGURES	6
ÍNDEX DE TAULES	10
AGRAÏMENTS	11
1 INTRODUCCIÓ	12
1.1 Introducció general	12
1.1.1 Aqüicultura Multitròfica Integrada (AMTI)	12
1.1.2 Les macroalgues i el gènere <i>Ulva</i>	13
1.1.3 El cultiu de macroalgues	15
1.1.4 Composició i interès de les macroalgues	17
2 OBJECTIUS	21
3 MATERIAL I MÈTODES	22
3.1 Disseny experimental	22
3.2 Mètodes analítics	26
3.2.1 Presa de la mostra	27
3.2.2 Pretractaments: determinació del contingut de matèria seca i trituració	28
3.2.3 Determinació del contingut en matèria mineral	30
3.2.4 Obtenció de la solució de cendres	33
3.2.5 Quantificació del fòsfor: colorimetria de Bray-Kurtz	35
3.2.6 Determinació del Nitrogen orgànic (proteïna)	41
3.2.7 Determinació del Nitrogen en forma de nitrats	46
3.3 Càlculs realitzats	51
3.3.1 Càlculs de la taxa de creixement (SGR)	51
3.3.2 Càlcul de l'assimilació de nutrients per part de les algues	51
4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	52
4.1 Composició de les algues	52
4.1.1 Resum de resultats	52
4.1.2 Evolució en el temps	54
4.1.3 Efecte de la densitat de cultiu	60
4.2 Extracció de nutrients	64
4.2.1 Creixement	64

4.2.2	Assimilació de nutrients	66
5	CONCLUSIONS	72
6	BIBLIOGRAFIA	73
7	ANNEX	77

Índex de figures

Figura 3.1-1: Esquema representatiu de l'experiment 1.	24
Figura 3.1-2: Esquema representatiu de l'experiment 2	25
Figura 3.2-1: Esquema representatiu dels diferents anàlisis realitzats a partir de l'alga	26
Figura 3.2-2: Algues recent extretes del tancs netejades i a punt per a posarles a l'estufa	28
Figura 3.2-3: Algues després de 24 hores a 60°C a l'estufa	29
Figura 3.2-4: Mostra d'algues seques i molturades.	30
Figura 3.2-5: Mostres d'alga molturada llestes per a ser precalcinades als cresols	31
Figura 3.2-6: Precalcinació de les mostres molturades.	31
Figura 3.2-7: Mostres precalcinades	32
Figura 3.2-8: Cendres procedents de les mostres un cop posades a la mufla a 550°C durant 14 hores	33
Figura 3.2-9: Procés de dissolució de les cendres	34
Figura 3.2-10: Colorímetre	35
Figura 3.2-11: Solucions de cendres i les seves dilucions guardades als tubs Falcon a la nevera	37
Figura 3.2-12: Patrons de fòsfor amb els reactius A i B de la reacció de color (blanc, 1ppm, ppm, 4ppm i 10ppm)	38
Figura 3.2-13: Recta de calibració del fòsfor	38
Figura 3.2-14: Mostres de les solucions de cendres diluïdes amb els reactius A i B	40
Figura 3.2-15: Mostra d'alga molturada empaquetada dins d'un tub Kjeldahl amb l'àcid sulfúric i el catalitzador	43

Figura 3.2-16: Mostres en el digestor Kjeldahl	43
Figura 3.2-17: Tubs Kjeldahl recent trets del digestor	44
Figura 3.2-18: Mostra en el procés de destil·lació	44
Figura 3.2-19: Mostres als tubs de centrífuga amb la solució extractant.	47
Figura 3.2-20: Extractes de les mostres després de passar per la centrífuga	48
Figura 3.2-21: Recta de calibració de nitrats	49
Figura 4.1-1: Composició en matèria seca de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)	55
Figura 4.1-2: Composició en percentatge de matèria mineral de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.	55
Figura 4.1-3: Composició en mg/100g de fòsfor de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.	56
Figura 4.1-4: Composició en percentatge de nitrogen orgànic de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.	56
Figura 4.1-5: Composició en percentatge de nitrogen nítric de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.	57

- Figura 4.1-6: Composició en percentatge de nitrogen total de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2) _____ 57
- Figura 4.1-7: Composició en percentatge de proteïna de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2) 58
- Figura 4.1-8: Composició en matèria seca (%) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 61
- Figura 4.1-9: Composició en matèria mineral (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 61
- Figura 4.1-10: Composició en fòsfor (mg P/100g sms) de les algues cultivades a diferents densitats de cultiu. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 61
- Figura 4.1-11: Composició en nitrogen orgànic (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 62
- Figura 4.1-12: Composició en nitrogen nítric (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 62
- Figura 4.1-13: Composició en nitrogen total (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 62
- Figura 4.1-14: Composició en proteïna (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1). _____ 63
- Figura 4.2-1: Creixement expressat en increment de grams de matèria seca per dia durant les 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2) _____ 65
- Figura 4.2-2: Taxa de creixement (SGR sms) durant les 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2) _____ 65
- Figura 4.2-3: Increment net de matèria mineral de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu. _____ 66



Figura 4.2-4 Increment net de fòsfor de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu. 67

Figura 4.2-5: Increment net de nitrogen de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu. _____ 67

Figura 4.2-6: Assimilació de matèria mineral de les algues durant els 2 experiments _____ 68

Figura 4.2-7 : Assimilació de fòsfor de les algues durant els 2 experiments _____ 69

Figura 4.2-8: Assimilació de nitrogen total de les algues durant els 2 experiments _____ 69

Índex de taules

Taula 3.1-1: Calendari del disseny experimental, en blau l'experiment 1 i en taronja l'experiment 2	22
Taula 3.1-2: Pesos i augment de pes de les algues per cada setmana en els dos experiments (Font: Klimaitis, 2016)	25
Taula 3.2-1: Taula indicativa d'una estimació de temps invertit per a fer les anàlisis.	26
Taula 3.2-2: Valors per a fer la recta de calibració del fòsfor	39
Taula 3.2-3: Valors per a fer la recta de calibració de nitrats	49
Taula 4.1-1: Mitjana dels valors, valors màxims, mínims i les desviacions (S) amb el coeficient de variació (CV) de tots els resultats dels anàlisis.	52
Taula 4.1-2: Recerques bibliogràfiques de treballs similars amb algues del gènere <i>Ulva</i> els seus resultats	53
Taula 4.2-1: Pesos, augment de pes obtinguts i SGR sms cada setmana (Font: Klimaitis, 2016)	64
Taula 4.2-2: Mitjana i desviació de l'assimilació en matèria mineral de les algues entre la setmana 2 i 5	70
Taula 4.2-3 Mitjana i desviació de assimilació en nitrogen total de les algues entre la setmana 2 i 5	71
Taula 4.2-4 Mitjana i desviació de l'assimilació en fòsfor de les algues entre la setmana 2 i 5	71

Agraïments

A la meva família perquè sense ells no hauria arribat a on soc ara, als meus amics més propers per a donar-me suport en certs moments durant la realització del treball i durant la carrera. A la Patricia Jiménez i a la Ingrid Masaló per a ajudar-me en els dubtes i problemes que van anar sorgint durant el treball.

1 Introducció

1.1 Introducció general

1.1.1 Aqüicultura Multitròfica Integrada (AMTI)

La producció mundial provinent de l'aqüicultura està augmentant al voltant d'un 10% anualment superant l'agricultura, la ramaderia i la pesca (FAO, 2010). En termes generals, l'aqüicultura és el sector de producció d'aliments amb un creixement més accelerat. Actualment representa quasi el 50% dels productes pesquers destinats a l'alimentació (FAO, 2013). Tanmateix, aquest ràpid desenvolupament de l'aqüicultura intensiva, en gran part al voltant de les costes de tot el món ha plantejat preocupacions relacionades amb la degradació del medi ambient, especialment amb la càrrega de nutrients que són aportats al mar per les pràctiques d'aquesta explotació.

L'aqüicultura multitròfica integrada (AMTI) és el cultiu d'organismes aquàtics amb diferents nivells tròfics en un mateix sistema. La combinació és d'organismes que requereixen d'aliments exògens (peixos) i d'organismes que extreuen els nutrients inorgànics dissolts (macroalgues) o el material orgànic en forma de partícules a l'aigua (mol·luscs). Els processos biològics i químics estan equilibrats. En altres paraules, és una pràctica en la que els residus d'una espècie són reciclats per a convertir-se en aliments per a una altra. L'AMTI és considerada una estratègia productiva que diversifica de manera sostenible els cultius i protegeix el medi ambient (Troell *et al.* 2003). L'AMTI també representa una sèrie de beneficis entre els que es destaquen: l'alleujament de la contaminació orgànica a través del reciclat de nutrients, els beneficis mutus pels organismes participants, l'increment de la producció i la optimització de l'ús de l'aigua i de la despesa energètica.

Depenent de la ubicació podem classificar els sistemes de AMTI en funció del flux d'aigua que rebin. Es diferencien en sistemes oberts (sense recirculació d'aigua) i tancats (amb tractament i/o acondicionament i recirculació). En sistemes oberts, si són sistemes a mar obert, existeix una dependència de les condicions hidrodinàmiques degut a fortes corrents amb les que ens podem trobar, ja que no és possible controlar el flux d'aigua. L'eficiència d'obtenció de



nutrients per part de les algues i mol·luscs en aquestes condicions és baixa. En sistemes tancats, que són sempre a terra, es pot exercir un gran control en l'efluent, ja que podem determinar el flux d'aigua que passa pel sistema. En aquests sistemes hi ha una major eficiència d'obtenció dels nutrients per part de les algues i mol·luscs.

1.1.2 Les macroalgues i el gènere *Ulva*

Hi ha molts tipus diferents d'algues, les que viuen en els mars, llacs i rius; i també podem diferenciar entre les algues microscòpiques, que romanen en suspensió a l'aigua constituint el fitoplàncton o plàncton vegetal mentre que unes altres viuen fixades a un substrat, i són aquestes les més aparents i conegudes comunament. Podem definir les algues marines com el conjunt de organismes tal·lòfits els quals el seu cicle biològic es desenvolupa en el medi marí. Aquests organismes tenen pigments fotosintètics que els permeten tenir una nutrició autòtrofa. En alguna fase del seu cicle vital romanen fixades a un substrat marí, creant així biofilms litorals més o menys homogenis (Apromar, 2015).

Les macroalgues són algues marines que reben aquest nom per distingir-les d'algues d'una mida microscòpica que estan formades per grups de cèl·lules; normalment les algues microscòpiques solen ser unicel·lulars.

Les macroalgues són productors primaris que generen oxigen i sintetitzen substàncies orgàniques a partir de la llum solar i les substàncies inorgàniques dissoltes en l'aigua, gràcies al procés de la fotosíntesi. Formen part del primer esglaó de la cadena tròfica en els ambients litorals.

La morfologia de les algues és molt variada i també la seva mida. Algunes algues unicel·lulars només arriben a unes micres de diàmetre, mentre que algunes algues brunes superen els 50 metres de longitud. Les macroalgues marines poden classificar-se en tres grans grups en funció del seu color que té a veure amb els pigments fotosintètics que contenen: brunes, vermelles i verdes. Els botànics anomenen a aquests grans grups feofícies, rodofícies i clorofícies respectivament (McHugh, 2002). Tant feòfits, com rodòfits com cloròfits tenen representants macroscòpics i microscòpics, hi ha macro i macroalgues tant marines com d'aigua dolça.

Les brunes solen ser grans, algunes fan 30 cm de longitud, però sovint arriben als 20 metres passant per algues gruixudes i resistents de dos a quatre metres d'amplada.

Les vermelles solen ser mes petites, generalment la seva longitud varia d'uns pocs centímetres a un metre. Les algues vermelles no sempre són de color vermell, a vegades són morat, inclús a vegades són de color vermell marronós. Tot i això els botànics les classifiquen com a rodofícies degut a les seves característiques.

Les verdes conformen un grup morfològicament molt divers que inclou representants unicel·lulars, colonials i filamentosos. També són petites, la seva mida és similar a la de les algues vermelles. Les algues verdes o clorofícies, és a dir, aquelles amb clorofil·la a i b, són un grup molt divers amb més de 8.000 espècies. Són molt variades pel que fa als cicles biològics i ambients que poden colonitzar.

Les macroalgues verdes també són de morfologia molt variable, des de formes senzilles filamentoses, mes o menys ramificades (*Cladophora*), laminars (*Ulva*) o discoïdals (*Ulvella*), fins a estructures complexes ramificades (*Codium*). Les cèl·lules de les algues verdes tenen normalment cel·lulosa a la paret cel·lular tot i que algunes presenten altres polisacàrids o inclús glicoproteïnes (Apromar. 2015).

Dins de aquest grup taxonòmic i en el camp de les macroalgues d'interès econòmic destaquen l'espècie d' *Ulva*, exclusiva d'aigües marines i salabroses. Pertanyen al grup de les macroalgues verdes, anomenades de forma vulgar enciam de mar, ja que presenten un tal·lus gran i aplanat que recorda al de les fulles de enciam i que conté una o dues capes de cèl·lules.

Són de morfologia molt senzilla, talussos tubulars i laminars de diàmetre variable, més o menys aplanats i a vegades ramificats. Per la seva mida, abundància i biomassa són el grup d'algues verdes més conegudes sent molt freqüents en molts litorals del món.

Les espècies d'*Ulva* proliferen en ambients il·luminats i amb excés de nutrients, per això abunden en zones portuàries, altres llocs protegits i estuaris, intervenint en la formació de les denominades "marees verdes". També suporten molt bé els canvis de salinitat (Apromar. 2015).

Ulva spp són unes de les principals espècies d'interès per treballar amb eficàcia en sistemes de aquicultura multitrofica integrada. *Ulva* sp són eliminadors eficients d'amoni (NH_4^+) present al medi i tenen una morfologia molt adequada per cultius en tancs. Tenen una taxa de creixement

que permet una gran facilitat per ser cultivades i al ser espècies intermareals tenen un ampli rang de tolerància amb la temperatura i la llum.

Ulva sp també es cultiva per al comerç mundial d'aliments però generalment té un valor inferior al d'altres algues vermelles o brunes. No obstant donat el seu valor nutricional, s'ha vist augmentada la seva comercialització en els últims anys. Les demandes actuals en el mercat dels aliments i en altres llocs tenen a veure amb el seu contingut aproximat en proteïnes del 15% sobre pes sec, el 50% sobre pes sec de sucre i midó, menys de l' 1% de lípids sobre pes sec i el seu alt contingut en ferro, iode, alumini, manganès, níquel, vitamines A, B1 i C, sodi, potassi, magnesi, calci, nitrogen soluble, fòsfor, silici, estronci, bari, radi, cobalt i bor (Winberg *et al.* 2009). També és un bon aliment amb fibra que afavoreix el bon funcionament del sistema digestiu.

Investigacions realitzades sobre la composició química, microbiològica i toxicològica de les espècies del gènere *Ulva* al malecon de la Paz (Mèxic), les recomanen pel consum humà i animal (Águila-Ramírez *et al.* 2002, Aguilera-Morales *et al.* 2005).

La macroalga verda *Ulva* s'ha utilitzat àmpliament com a biofiltre degut a la seva alta eficiència per a incorporar compostos inorgànics nitrogenats (fins un 90% en forma d'amoni) de les aigües residuals residuals(Neori *et al.* 1991; Jiménez del Río *et al.* 1996). Moltes algues *Ulva* spp mostren la capacitat d'absorbir i metabolitzar ràpidament diferents formes inorgàniques de nitrogen , principalment nitrats i amoni depenent de la seva disponibilitat. Malgrat que l'amoni pot ser tòxic o inhibidor per a algunes macroalgues marines amb concentracions relativament baixes, és una forma de nitrogen que l'*Ulva* i altres espècies de macroalgues toleren (Pinchetti *et al.* 1998).

1.1.3 El cultiu de macroalgues

Abans de justificar el desenvolupament de cultius de macroalgues, s'ha de recordar el paper que aquestes tenen sobre el medi natural, al constituir un punt de partida dels nivells tròfics i així assegurar la producció de tots els herbívors i carnívors aquàtics, a més de produir la major part d'oxigen en aquest medi. D'altra banda exerceixen un paper molt important participant en la descontaminació de les aigües utilitzant els nitrats i els fosfats dissolts a la vegada que estimulen

el desenvolupament de microorganismes amb substàncies expulsades que afavoreixen el seu creixement.

El desenvolupament de cultius de macroalgues es pot realitzar directament en el mar, pot ser mixt, combinant unes fases en terra per després ser complementades en el mar i finalment també poden ser completament en terra. Per al cas del cultiu en el mar, només es pot dur a terme sobre espècies que es desenvolupen mitjançant la propagació vegetativa, realitzant-se una fragmentació manual o mecànica i una sembra dels fragments. Pel que fa al cultiu desenvolupat en dos emplaçaments (mar-terra), el desenvolupament i la recol·lecció es realitza en el mar, però el sembrat es fa al laboratori. Finalment, el cultiu que es realitza totalment en terra, es fa en tancs i precisa de menys mà d'obra però més qualificada (Corral *et al.* 2000)

Hi ha un conjunt de factors físics que incideixen en les condicions de cultiu de les macroalgues: el substrat, la hidrodinàmica, la llum i la temperatura.

També hi ha factors químics que afecten a les condicions de cultiu: la salinitat, el pH i els nutrients.

El substrat és important des del punt de vista de les seves propietats físiques ja que les macroalgues a diferència de les plantes terrestres absorbeixen els nutrients inorgànics que necessiten directament del medi aquàtic que les envolta. El substrat en aquest cas, només té la funció de fixació.

La hidrodinàmica és un dels factors més importants en l'ecologia i distribució de les algues marines. En el medi marí la hidrodinàmica ve determinada fonamentalment per les onades, els corrents i les oscil·lacions mareals.

La llum és un factor ecològic molt important, ja que les algues són éssers autòtrofs que la necessiten per a la seva nutrició, per això només poden viure en medi aquàtic on hi arribi la llum. Les variacions en la quantitat, qualitat i periodicitat de la llum condicionen notablement el desenvolupament de les macroalgues. A més biomassa, més competència per la llum i per els nutrients.

La temperatura, juntament amb la llum, és un dels factors físics més importants sobre les algues. La llum i la temperatura tenen una influència en molts processos fisiològics de les algues ja que d'aquests factors depenen l'efectivitat de la fotosíntesi, la respiració i els processos reproductius.



Les aigües marines es comporten com a medis de cultiu amb sals i elements en dissolució, alguns d'aquests factors químics són essencials per a les algues, mentre que altres poden arribar a ser perjudicials en determinades concentracions. La salinitat es defineix com el percentatge en pes de sals per litre d'aigua, principalment clorurs de sodi, potassi i magnesi. Normalment el mar té una salinitat de 30 g/L. Algunes algues com l' *Ulva* sp són capaces de suportar canvis en la salinitat des de pràcticament 0 g/L fins a 70 g/L.

El factor del pH ens indica el nivell d'acidesa o d'alcalinitat de les aigües i actua modificant les formes dels diferents compostos i elements químics presents en l'aigua. Generalment el pH del mar està sobre 7.4 i 7.8 cosa que vol dir que és lleugerament alcalí.

Pel que fa als nutrients, les algues tot i ser éssers autòtrofs i que utilitzen la llum com a font d'energia per als seus processos de creixement i reproducció, necessiten captar del medi que les envolta tots els elements inorgànics que necessiten per a fer-ho possible.

Principalment són C, O, H, N i P. Els tres primers són bastant abundants a l'aigua en forma de sals o gasos dissolts, però els altres com el nitrogen i el fòsfor a vegades són escassos per tant a poden ser un factor limitant en relació a la quantitat de matèria viva que pot haver-hi en una massa d'aigua.

De fet, les tècniques de cultiu s'estan millorant amb l'objectiu principal d'obtenir major biomassa d'algues que presenti unes qualitats específiques. El control del nitrogen és un dels més importants per al cultiu intensiu d'algues degut al seu paper clau en el creixement i regulació del metabolisme (Pinchetti *et al.* 1998).

A més a més l'excés de nitrogen i d'altres nutrients pot ser emmagatzemat i utilitzat per al creixement durant períodes amb nutrients limitats per una sèrie de macroalgues inclosa *Ulva fenestrata* (Naldi i Wheeler, 1999).

1.1.4 Composició i interès de les macroalgues

Les macroalgues es poden utilitzar com a un bio-indicador dels nutrients a l'aigua degut a la seva capacitat per a assimilar-los del seu voltant ràpidament. El seu contingut en nutrients pot indicar dins d'un període curt de temps la riquesa de l'aigua.

En general, les macroalgues manifesten una gran variació en el contingut de nutrients, fet que està relacionat amb varis factors ambientals com la temperatura de l'aigua, la salinitat, la llum i els nutrients.

Fent una mica d'història, si retrocedim fins al segle XIV, trobem que s'utilitzaven les algues per abonar les terres llaurades a les zones costaneres aprofitant les que eren arrossegades per les mareas fins la costa. S'utilitzaven fresques o s'emmagatzemaven i es deixaven fermentar fins el moment de repòs de les collites per així enfortir les zones de llaurar. Les algues també s'utilitzaven per a fer pinsos i alimentar animals, es basava en la riquesa nutricional de les mateixes que tenien uns alts nivells de proteïnes, vitamines i microelements.

Durant els últims 50 anys, la demanda ha crescut més ràpid que la capacitat per a satisfer les necessitats amb les algues silvestres. La investigació sobre el seu cicle vital ha proporcionat el desenvolupament d'indústries dedicades al seu cultiu, que actualment representen més del 90% de la demanda del mercat.

Els usos **industrials** dels extractes d'algues marines es van expandir ràpidament després de la segona guerra mundial. La principal aplicació de l'agar és el seu ús com a medi de cultiu microbiològic.

L'alginat, l'agar i la carragenina són espessants i gelificants que s'extreuen de les algues marines i representen la base principal dels usos industrials d'aquestes. La utilització d'algues marines com a font d'aquests gelificants es remunta a l'any 1658 quan es van descobrir al Japó les propietats gelificants de l'agar que s'havia extret mitjançant aigua calenta en una alga vermella. Els extractes del *Chondrus crispus* que es un altre alga vermella contenen carragenina i van ser molt utilitzats com a espessants al segle XIX, mentre que els extractes d'algues brunes no van començar a produir-se comercialment com a espessants i gelificants fins la dècada de 1930. Les carragenines s'utilitzen especialment com agent clarificant en la fabricació de begudes i com a estabilitzador en certes emulsions. Els alginats s'utilitzen com espessants d'aliments i productes farmacèutics. Si s'afegeix una sal de calci a una dissolució d'alginat sòdic, es forma un gel, aquesta propietat és molt útil en les indústries alimentàries i farmacèutiques. També es pot obtenir alginat càlcic en formes de fibres, les quals s'utilitzen per fabricar bandatges quirúrgics.



Des de un punt de vista **nutricional**, les macroalgues són aliments baixos en calories amb un alt contingut en minerals (Mg, Ca, P, K i Na), vitamines, proteïnes i hidrats de carboni no digeribles, és a dir fibra dietètica. També tenen un baix contingut en lípids. Les macroalgues també contenen més vitamina A, B12 i C, β -caroté, acid fòlic, riboflavina i niacina que moltes fruites i verdures. El contingut en fibra dietètica se situa entre el 33% i el 75% sobre pes sec i es compon principalment de polisacàrids solubles. Un nutrient molt important com el iode es troba generalment a totes les macroalgues en uns nivells alts. El contingut en iode és major en les algues brunes que a les verdes i vermells però tot i això, les algues verdes tenen un contingut en iode bastant més alt en comparació amb altres aliments com l'arròs o el tomàquet.

S'ha documentat que les algues marines s'utilitzaven com aliment durant el segle IV al Japó i al segle VI a la Xina. Avui dia, aquets dos països i la república de Corea són els majors consumidors d'algues marines **com aliment**, i la seva demanda representen la base per a una indústria que obté 6 milions de tones d'algues fresques a l'any en tot el món per un valor de 5000 milions de dòlars EE.UU. (McHugh, 2002). En els últims anys, algunes institucions franceses d'investigació i desenvolupament han fet un gran esforç per a elaborar productes comestibles d'algues marines amb l'objectiu d'introduir-los en la dieta i el mercat europeu. A la dècada del 1960, Noruega va ser el primer país en produir farina d'algues, feta d'algues brunes dessecades. Aquesta farina era utilitzada com additiu de pinsos. Anualment es recol·lecten unes 50000 tones de macroalgues amb les que es fabriquen 10000 tones de farina d'algues amb un valor de 5 milions de dòlars EE.UU.

Es poden trobar productes que tenen com a base algues salades, dessecades i fresques en quasi tot el món. Aquesta és la base comercial de la indústria alimentària de les algues marines. Les poblacions costaneres de molts països consumeixen també algues marines, unes com part de formes de vida basades en una economia de subsistència i altres com a ingredient

habitual de certes amanides, especialment a Hawaii i els països més càlids d'Àsia oriental com per exemple: Indonèsia, Malàisia, Filipines i Tailàndia.

Les tres algues marines més importants utilitzades com aliment humà són varies espècies de *Porphyra* (anomenada vulgarment nori al Japó) *Laminaria* (Kombu) i *Undaria* (Wakame). En els últims anys *Porphyra* ha figurat en les estadístiques japoneses sobre pesca com la tercera captura

en ordre d'importància. Aquestes tres algues s'obtenien inicialment d'espècies silvestres, però en l'actualitat, només és possible cobrir la demanda utilitzant cultius a gran escala. *Porphyra* està classificada com una alga vermella, mentre que *Laminaria* i *Undaria* són algues brunes.

Totes aquestes aplicacions són motiu més que suficient per a despertar l'interès i dur-ne a terme cultius.

En ambients aquàtics el nitrogen i els fòsfor són els principals contaminants de la aquicultura i a la vegada són dos dels nutrients més importants que solen limitar la producció de biomassa de les macroalgues (Amosu, 2016).

Degut al conflicte d'usos que es dona a les costes marítimes en els últims anys s'aposta per una aquicultura intensiva en tancs, i més concretament pels sistemes de recirculació (RAS). En aquests sistemes l'aigua de sortida dels tancs s'acondiciona mitjançant filtres biològics, on el nitrogen amoniacal excretat pels peixos es transforma en nitrit primer i finalment en nitrat. El nitrat es va acumulant en el sistema (a menys que no hi hagi un sistema de desnitrificació) i pot arribar a ser tòxic pels peixos (>50 ppm N-NO_3); la renovació d'aigua del sistema és l'estratègia més comuna per tal de reduir els nivells de nitrats.

La integració de macroalgues en sistemes RAS (AMTI-RAS) permet reduir la concentració de nitrats a l'aigua per així reduir la renovació de l'aigua, a part el CO_2 generat a les instal·lacions per els peixos és aprofitat per les algues per a realitzar la fotosíntesi i alhora produir oxigen que pot ser aprofitat per els peixos ; finalment s'obté un subproducte (les algues) amb valor econòmic, que ajudarà a la diversificació de la producció.

Amb tot això, i sabent que abans de realitzar el cultiu de qualsevol espècie de macroalga és necessari adequar la tècnica de cultiu a la biologia i les característiques de l'espècie, calen treballs per estudiar quines macroalgues es poden adaptar a les condicions existents en el cultiu de diferents espècies aquícoles.

S'ha de investigar i fer proves canviant les condicions de cultiu per a poder fer una planificació dels Kg/m^2 d'alga necessaris per a optimitzar l'eliminació de nutrients en l'aigua de les instal·lacions aquícoles.



2 Objectius

Partint de la premissa que la densitat de cultiu influeix directament en la quantitat de llum que reben les macroalgues, l'objectiu principal d'aquest treball és l'estudi de la influència que té la densitat de cultiu en la composició nutricional bàsica (contingut en matèria mineral, proteïna, nitrats i fòsfor) de les macroalgues marines de l'espècie *Ulva ohnoi*.

Hi ha dos objectius secundaris:

A partir de les dades setmanals de creixement també s'estudiarà l'assimilació de nutrients (minerals, nitrogen i fòsfor) per part de les macroalgues. Aquesta assimilació s'avaluarà també, en funció de les tres diferents densitats de cultiu. Les dades de creixement són les que han estat obtingudes, paral·lelament a aquest estudi, per Klimaitis (2016).

Com a objectiu secundari també es pretén estudiar l'efecte de l'augment de l'aport de nutrients i la modificació del pH de l'aigua d'entrada dels tancs en la composició i assimilació de les macroalgues.

3 Material i mètodes

3.1 Disseny experimental

El disseny experimental consta de dos experiments (experiment 1 i experiment 2) realitzats un a continuació de l'altre d'acord al calendari que s'indica en En la 3.1-1.

Taula 3.1-1: Calendari del disseny experimental, en blau l'experiment 1 i en taronja l'experiment 2

	dilluns	dimarts	dimecres	dijous	divendres	dissabte	diumenge
Setmana 0	25-gen	26-gen	27-gen	28-gen	29-gen	30-gen	31-gen
Setmana 1	01-feb	02-feb	03-feb	04-feb	05-feb	06-feb	07-feb
Setmana 2	08-feb	09-feb	10-feb	11-feb	12-feb	13-feb	14-feb
Setmana 3	15-feb	16-feb	17-feb	18-feb	19-feb	20-feb	21-feb
Setmana 4	22-feb	23-feb	24-feb	25-feb	26-feb	27-feb	28-feb
Setmana 5	29-feb	01-mar	02-mar	03-mar	04-mar	05-mar	06-mar
Setmana 6	07-mar	08-mar	09-mar	10-mar	11-mar	12-mar	13-mar
Setmana 7	14-mar	15-mar	16-mar	17-mar	18-mar	19-mar	20-mar

- Experiment 1

S'estudien 3 tancs de macroalgues integrats en una instal·lació AMTI amb llenguados (*Solea senegalensis*) a l'ESAB amb *Ulva ohnoi* amb les mateixes condicions de cultiu (llum, temperatura, pH, salinitat i cabal d'entrada de nutrients) però cada tanc té una densitat de cultiu diferent, de 0.8 Kg/m², 1Kg/m² i 1.2 Kg/m². Es fa un seguiment setmana a setmana durant 5 setmanes fent anàlisis de la composició de les algues i es valora la seva variació temporal. A la Figura 3.1-1: Esquema representatiu de l'experiment 1. es representa un esquema de l'experiment 1. Aquest experiment es va iniciar la setmana del dilluns 25 de gener i va tenir una durada de 5 setmanes fins a la setmana del dilluns 29 de febrer en la que 3 tancs amb macroalgues de l'especie *Ulva ohnoi* anomenats R1, R2 i R3 rebien cabals constants (4L/h) provinents de l'aigua dels peixos (Taula 3.1-1). Es va deixar una primera setmana d'aclimatació (setmana 0, 25-31 de gener) ja que els tres tancs d'algues venien d'unes condicions molt diferents en les que en un tanc se li afegia àcid per a controlar el pH i els altres dos tancs no se'ls hi controlava el pH de cap manera.

La densitat de cultiu dels tancs de les macroalgues R1, R2 i R3 eren respectivament 0.8 Kg/m^2 , 1.0 Kg/m^2 i 1.2 Kg/m^2 . Es tractaven de tanc cilíndrics amb una àrea de 0.322 m^2 i un volum de 90 L , tenien una il·luminació amb focus de 200 W cada un (densitat de flux de fotons fotosintètics PPFD: $0.280 \text{ mmol/m}^2 \text{ s}$). El període de llum que se'ls hi aplicava era de 12 hores sempre compreses entre les 10:30 del matí i les 10:30 de la nit. Els tres tancs també disposaven d'unes resistències per a controlar la temperatura de l'aigua que aproximadament es mantenia al voltant de 18°C . Per a controlar el pH s'afegia una certa quantitat d'àcid (HCl) a un dipòsit on es barrejava l'aigua dels peixos amb l'àcid i seguidament es bombejava l'aigua cap al tanc de les algues. Mentre les algues van consumint el CO_2 per a fer la fotosíntesi el pH va augmentant, per això s'ha d'incorporar àcid a l'aigua per a fer baixar el pH i per que així les formes del carboni (principalment bicarbonats) passin a ser diòxid de carboni. Es van utilitzar bombes peristàliques per a controlar el cabal d'aigua cap al tanc de les algues. Entre el tanc dels peixos i el dipòsit boia, hi havia un altre tanc (expansió) on hi havia un filtre biològic constituït per bioboles on creixen microorganismes que absorvien l'amoni dels peixos i el passaven a nitrit i nitrat, d'aquesta manera es reduïa la concentració d'amoni a l'aigua. D'aquest tanc es recirculava una gran part cap al tanc dels peixos i l'altre s'anava al dipòsit boia.

Per a mantenir les densitats de cultiu prèviament establertes cada dilluns es deixaven als tancs R1, R2 i R3 amb 265 g (0.8 Kg/m^2), 320 g (1.0 Kg/m^2) i 384 g (1.2 Kg/m^2) d'algues respectivament. I així cada dilluns es pesen les algues de cada tanc (Taula 3.1 2). La biomassa sobrant era retirada per a fer les anàlisis pertinents d'aquest treball i es deixaven els pesos establerts per a mantenir les densitats de cultiu. A continuació, a la Figura 3.1-1 es mostra un esquema representatiu del primer experiment.

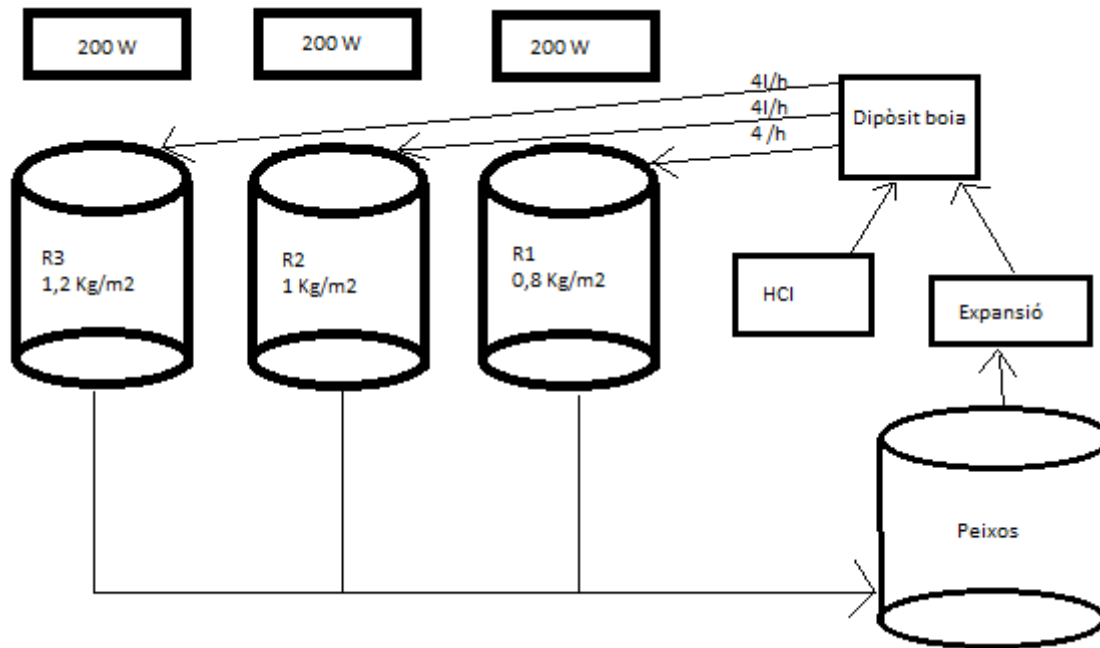


Figura 3.1-1: Esquema representatiu de l'experiment 1.

- Experiment 2

A la Figura 3.1-2: Esquema representatiu de l'experiment 2 es representa un esquema de l'experiment 2. La setmana del dilluns dia 29 de febrer es va modificar l'instal·lació, la concentració d'àcid que se li afegia al dipòsit boia es va augmentar.

D'altra banda, els cabals d'aigua des del dipòsit boia, que era on es barrejava l'àcid amb l'aigua dels peixos fins als tancs R1, R2 i R3 es van modificar, eren de 4 L/, 5L/h i 6L/h respectivament per a veure si augmentant l'aport d'àcid als tancs R2 i R3 la composició de les algues també es veia afectada.

Els altres factors com la llum, la temperatura i el fotoperíode eren exactament els mateixos als tres tancs amb macroalgues. Aquest experiment va tenir una durada de dues setmanes, fins la setmana del dilluns dia 14 de març. Com al primer experiment, les algues es pesaven setmanalment (Taula 3.1-2) per a deixar-les amb les densitats de cultiu prèviament establertes i una part sobrant era destinada per a fer les anàlisis pertinents.

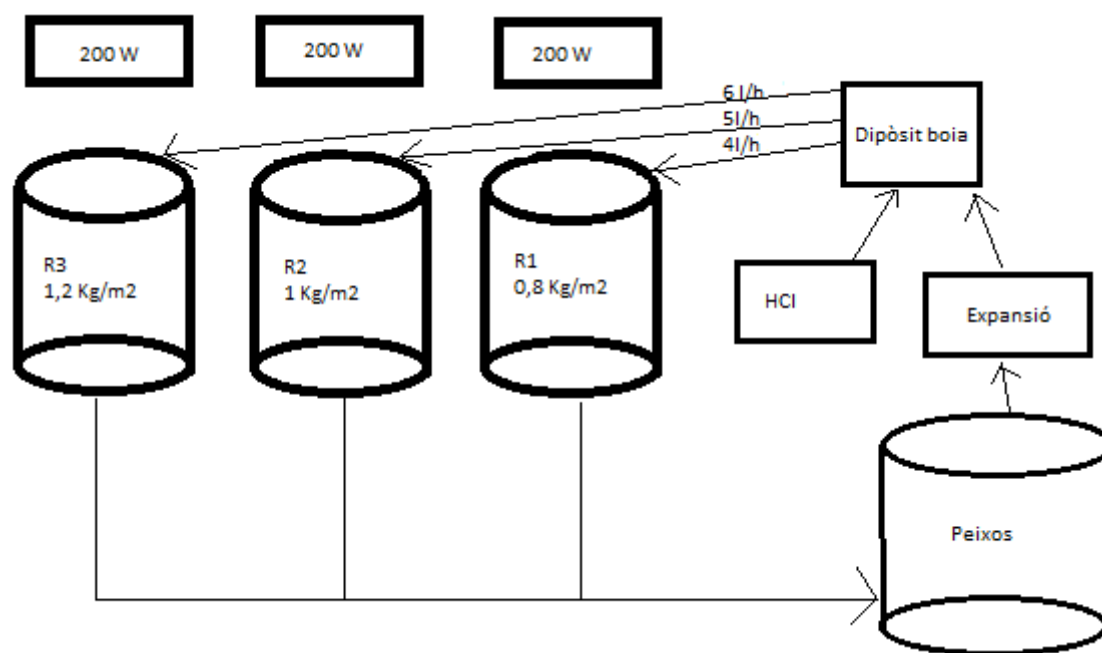


Figura 3.1-2: Esquema representatiu de l'experiment 2

L'aigua provinent del peixos tenia unes concentracions de N-NO_3 i P-PO_4 durant les 7 setmanes de 29.1 ± 4.1 i 0.9 ± 0.1 ppm de N i P, respectivament.

Taula 3.1-2: Pesos i augment de pes de les algues per cada setmana en els dos experiments (Font: Klimaitis, 2016)

	Pes inicial alga (g)			Pes final alga en 1 setmana (g)			Creix (▲ Pes g)			Creix (g/dia)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
S0 25/01/2016	265	265	265	527,3	416,1	422,4	262,3	151,1	157,4	37,5	21,6	22,5
S1 01/02/2016	265	320	384	473,2	492,1	490	208,2	172,1	106,0	29,7	24,6	15,1
S2 08/02/2016	265	320	384	538,6	549,2	556,7	273,6	229,2	172,7	39,1	32,7	24,7
S3 15/02/2016	265	320	384	529	580,1	771,3	264,0	260,1	387,3	37,7	37,2	55,3
S4 22/02/2016	265	320	384	536,9	522,8	618,5	271,9	202,8	234,5	38,8	29,0	33,5
S5 29/02/2016	265	320	384	501,5	554	667,5	236,5	234,0	283,5	33,8	33,4	40,5
S6 07/03/2016	265	320	384	449,7	568,3	608,4	184,7	248,3	224,4	26,4	35,5	32,1
S7 14/03/2016	265	320	384	416,5	479,5	581,5	151,5	159,5	197,5	21,6	22,8	28,2

3.2 Mètodes analítics

A la Figura 3.2-1 hi ha un esquema resum dels procediments en que consisteixen les anàlisis de les algues en aquest treball. A la Taula 3.2-1 es pot visualitzar la feina realitzada i una aproximació de les hores dedicades per a fer la part experimental d'aquest treball.

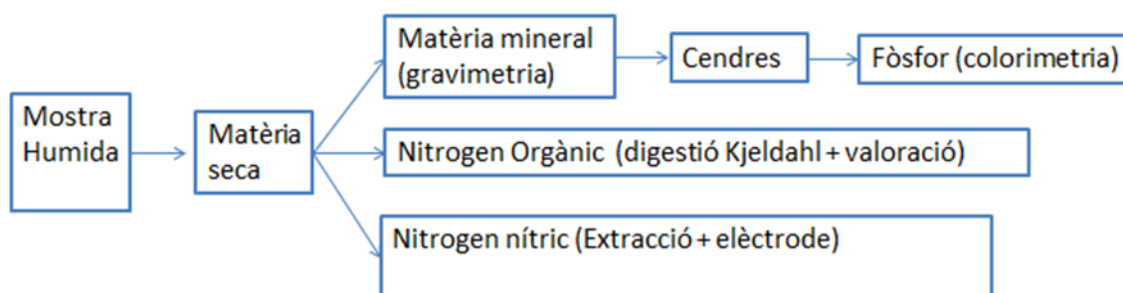


Figura 3.2-1: Esquema representatiu dels diferents anàlisis realitzats a partir de l'alga

Taula 3.2-1: Taula indicativa d'una estimació de temps invertit per a fer les anàlisis.

Anàlisi	Temps (per a les tres mostres dels tancs R1, R2 i R3 d'una setmana amb les seves 3 rèpliques) es a dir s'ha de multiplicar per 8 setmanes.
Matèria seca	Per a preparar les mostres per a assecar-les estava <u>1 hora</u> i després havien de estar 1 dia a l'estufa.
Matèria mineral	Per tarar els cresols, pesar les mostres, precalcinar-los y posar-los a la mufla trigava <u>1 hora 30 minuts</u> i després havien de estar 14 hores a la mufla .
Fòsfor	Havia de esperar <u>30 minuts</u> per a deixar refredar les mostres de la mufla al dessecador i després trigava <u>30 minuts</u> mes per pesar els cresols. Per a fer les solucions de cendres i guardar-les a la nevera en tubs falcon estava <u>3 hores</u> i després per a fer les dilucions , les lectures i la recta de calibració estava unes <u>2 hores</u> .

Nitrogen Orgànic	Entre pesar i preparar les mostres per a posar-les al digestor trigava <u>1 hora</u> . Les digestions duraven <u>1 hora</u> y per a destil·lar totes les mostres estava <u>3 hores</u> .
Nitrogen Nítric	Per a preparar les extraccions necessitava <u>1 hora</u> , <u>30 minuts</u> per a agitar les mostres, <u>10 minuts</u> per a centrifugar-les i <u>1 hora 30 minuts</u> per a fer les lectures i la recta de calibració.
Total	<u>135 hores</u> (no s'ha tingut en compte el temps per a fer les proves prèvies per aprendre els mètodes, el temps per a fer les repeticions de certes setmanes per algun resultat estrany i el temps necessari per a preparar els reactius).

3.2.1 Presa de la mostra

A continuació s'especifica les pautes seguides per fer la presa de mostra de les algues dels tancs i alhora iniciar la determinació de la matèria seca.

1. Cada dilluns al laboratori de peixos es buidaven tots els tancs d'algues i es pesaven per separat el total de biomassa que contenien. Les algues es centrifugaven per obtenir la major aproximació de pes fresc.
2. Seguidament s'apartava la necessària per a tornar-la a cada tanc per mantenir la densitat de cultiu fixada inicialment i la que sobrava era la que em servia per a fer l'anàlisi.
3. Es pesaven les algues sobrants i les posaven en tres recipients diferents prèviament tarats per diferenciar cada tanc.
4. S'apuntava el pes i després es feia un rentat previ amb aigua destil·lada per tal d'eliminar l'excés de sal a la superfície de les algues, cosa que podia interferir en el contingut de matèria seca i de matèria mineral.

5. El pes s'apuntava abans ja que si mesurava després de fer el rentat amb aigua destil·lada augmentava notablement per el fet de que les algues guanyaven pes en forma d'aigua per diferencia de concentració osmòtica i això podia fer variar el percentatge de matèria seca que calculava després, finalment es tornava a centrifugar per així les mostres es poguessin assecar més ràpid a l'estufa.



Figura 3.2-2: Algues recent extretes del tancs netejades i a punt per a posarles a l'estufa

3.2.2 Pretractaments: determinació del contingut de matèria seca i trituració

Material i Reactius

- Balança
- Estufa
- Dessecador
- Molinet/Picadora
- Safates
- Pots per guardar mostra molturada

Procediment

Assecat. Determinació de la humitat/matèria seca

Es pesava amb la balança una quantitat de mostra humida de cada tanc que estava al voltant de 200g en un recipient prèviament tarat i seguidament es feia el rentat amb aigua destil·lada per eliminar el excés de sal. A continuació s'omplien safates amb les mostres ja aclarides i es posaven a l'estufa a 60°C durant 24 hores (que era el temps mínim per a arribar a pes constant) per a després (un cop arriben a temperatura ambient, dins del dessecador) tornar a pesar i poder calcular el percentatge d'humitat/matèria seca. A continuació a l'equació es mostra com es calcula el % de matèria seca.

$$\% \text{ M. seca} = \frac{\text{pes(g) després de 24 h a } 60^{\circ}\text{C} - \text{tara recipient(g)}}{\text{pes(g) abans de rentar amb aigua destil·lada} - \text{tara recipient(g)}} \times 100$$



Figura 3.2-3: Algues després de 24 hores a 60°C a l'estufa

Trituració

Es passaven les mostres seques dels diferents tancs per el molinet per a triturar-les fins a arribar a una pols homogènia i després es guardaven en diferents pots degudament etiquetats per a diferenciar els tancs i les setmanes.



Figura 3.2-4: Mostra d'algues seques i molturades.

3.2.3 Determinació del contingut en matèria mineral

El contingut de matèria mineral es realitzava a través d'una gravimetria indirecta durant una calcinació. La calcinació consisteix en una combustió progressiva a l'aire de la matèria orgànica en un forn mufla a una temperatura de 550°C durant 14 hores. El residu restant després de la calcinació es la matèria mineral o cendres.

Material i Reactius

- Balança analítica
- Forn mufla
- Placa calefactora per gresols
- Gresols
- Dessecador



Figura 3.2-5: Mostres d'alga molturada llestes per a ser precalcinades als cresols

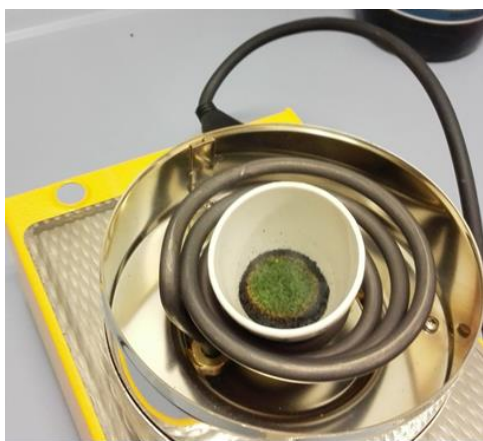


Figura 3.2-6: Precal·linació de les mostres molturades.

Procediment

Es taraven una sèrie de gresols prèviament pretractats a 550°C durant unes 4 hores i deixats en un dessecador i a continuació s'introduïen al voltant de 1,5g de mostra seca triturada en una balança analítica de fins a 4 decimals.

Abans de posar els gresols a la mufla amb la mostra a dins s'havia de precalcinar la mostra en una manta calefactora fins que deixés de treure fums. Això es feia perquè si es posava la mostra

directament a 550°C podria inflamar o bé formar molt contingut de carbó i això podria alterar notablement els resultats. Després de precalcinar s'introdueixen els gresols a la mufla i estaven 14 hores. Aquest temps era establert prèviament amb un seguit de proves fins que vam esbrinar que s'arribava a pes constant a les 14 hores. Un cop passades aquestes hores es treien els gresols, es deixaven refredar al dessecador i després es pesaven per poder determinar la matèria mineral. A continuació a l'equació es mostren els càlculs per arribar al % de matèria mineral (MM).

Càlculs i expressió de resultats:

$$\% \text{ MMsms} = \frac{\text{Pes (final(g) - Tara gresol (g))}}{\text{Pes (g) mostra seca}} \times 100$$



Figura 3.2-7: Mostres precalcinades



Figura 3.2-8: Cendres procedents de les mostres un cop posades a la mufla a 550°C durant 14 hores

3.2.4 Obtenció de la solució de cendres

A continuació de la determinació de contingut de matèria mineral i eliminada la fracció orgànica els elements queden mineralitzats en forma de cendres. Aquestes cendres al ser dissoltes amb un àcid diluït i amb escalfor es pot obtenir una solució que serveix per determinar molts elements entre els quals ens interessa el fòsfor.

Materials i Reactius

- Bany de sorra
- Pipetes de 10mL i de 2,5mL
- Matrassos aforats i embuts
- Paper de filtre sense cendres
- Àcid nítric (HNO_3 3M)
- Tubs Falcon

Procediment

Les cendres que estaven als gresols es tractaven amb 15 mL d'àcid nítric HNO_3 3 M sobre un bany de sorra uns 20-30 minuts aproximadament per a que així l'àcid pogués dissoldre les cendres completament. Un cop passada la mitja hora es filtraven les cendres amb un embut i paper de filtre sense cendres i es recollia el filtrat en un matràs aforat de 50mL.

El paper de filtre sense cendres s'utilitzava per evitar contaminacions. El procés era delicat i es tenia que anar amb compte ja que no es podria perdre cap gota de solució de cendres. S'havia de netejar el paper del filtre amb aigua destil·lada 2 o 3 cops per assegurar-se que tot el contingut anava al matràs aforat i finalment s'enrasava a 50mL. La mostra s'agitava per així poder homogeneïtzar i la solució obtinguda (solució de cendres) es guardava en uns recipients (tubs Falcon) a la nevera.



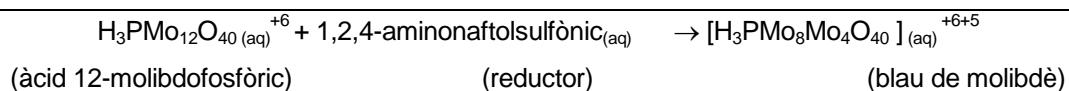
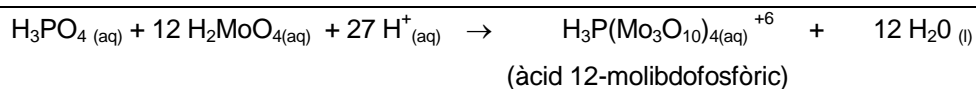
Figura 3.2-9: Procés de dissolució de les cendres

3.2.5 Quantificació del fòsfor: colorimetria de Bray-Kurtz

A partir de la solució de cendres es va determinar el contingut en fòsfor per colorimetria. Les colorimetries de fòsfor estan basades en els colors que adquireixen els productes de reducció dels anomenats heteropoliàcids del fòsfor. Els heteropoliàcids es formen mitjançant la coordinació dels grups molibdat, actuant el P com àtom central, substituint aquells als àtoms d'oxigen del grup PO_4^{3-} , reacció que té lloc en medi àcid i que podem representar com:



Figura 3.2-10: Colorímetre



L'àcid molibdo-fosfòric té una coloració groga molt intensa, però la seva utilització per a la determinació colorimètrica del P no és recomanable, per això, s'utilitza més el seu producte de reducció (el blau de molibdè) que presenta màxim d'absorció a 660nm. S'ha de treballar en condicions molt controlades i llegir l'absorbància dins d'un període de temps molt curt.

Material i Reactius

- Colorímetre
- Reactiu A (compost de Molibdè)
- Reactiu B (reactiu reductor)
- Aforats i pipetes
- Tubs assaig
- Solució mare de fòsfor 100ppm P: (0,439 g KH_2PO_4 /1L) .
- Solució de 20 ppm P. Es prepara amb 200mL de solució mare i enrasant a 1 litre
- Patrons de P (1mg P/L 2mgP/L 4mgP/L i 10mgP/L)
- Agitador de tubs

Procediment

Calibratge

Consistia en preparar solucions amb concentracions exactament conegudes (patrons) i llegir-les amb l'aparell de tal manera que es podia trobar una relació entre l'absorbància i la concentració de fòsfor. La lectura de la solució de mostra havia de tenir una concentració situada dins del rang dels patrons i si fos més gran s'havien de fer dilucions per arribar al rang dels patrons.

Preparació de les solucions patrons

A partir de la solució de 20 mg/L de P es preparaven 4 solucions de concentracions diferents per a cobrir un rang lineal. Aquestes solucions serien les solucions patro que utilitzaríem per a fer la recta de calibració. Es preparaven solucions de (1, 2, 4 i 10 mg/L de P) a matrassos aforats de 100mL. Per a fer el patro de 1 mg/L s'agafaven 5mL de la solució de 20 mg/L, per al patro de 2 mg/L s'agafaven 10mL, per al de 4 mg/L s'agafaven 20mL i per a fer el de 10 mg/L s'agafaven 50mL de la solució d 20mg/L.





Figura 3.2-11: Solucions de cendres i les seves dilucions guardades als tubs Falcon a la nevera

Dilució de la solució de cendres (SC)

Les solucions de cendres que teníem guardades als tubs Falcon dins la nevera generalment tenien un contingut en fòsfor superior al del patró més alt que era de 10 mg/L de P, per tant s'havia de fer una dilució de aquestes solucions. Es va arribar a la conclusió que tenint el compte el contingut esperat de fòsfor i que els patrons utilitzats oscil·laven entre 1 i 10 mg/L de P vam decidir fer dilucions (1/20) de les solucions de cendres per a poder realitzar les lectures correctament. S'agafaven 2,5mL amb pipetes de la solució de cendres i s'enrasaven amb aigua destil·lada en un matràs aforat de 50mL. El contingut del matràs es guardava en uns altres tubs Falcon degudament etiquetats per al seu posterior us.

Reacció de color

Primerament s'omplien amb una pipeta de 10mL tubs d'assaig amb cadascuna de les solucions patrons, a més, s'omplia un tub d'assaig amb 10mL d'aigua destil·lada, aquest tub s'anomena blanc. Seguidament s'omplien altres tubs d'assaig amb 10mL de les mostres de les dilucions de les solucions de cendres que es volien llegir.

A tots aquests tubs d'assaig, patrons, blanc i mostres s'afegien a cada tub 10 gotes del reactiu A i després 10 gotes del reactiu B. Es remenava be per homogeneïtzar els reactius i es deixava reposar uns 15 minuts.

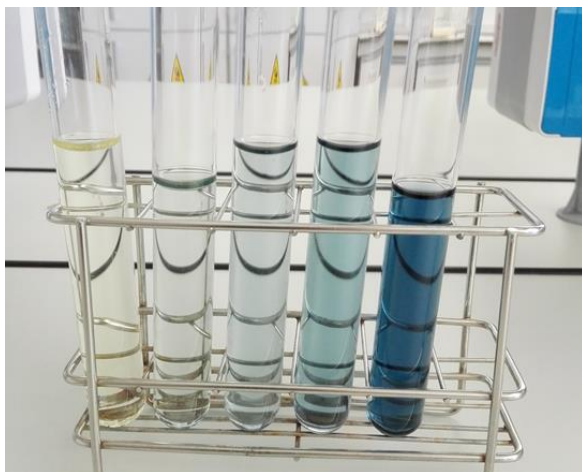


Figura 3.2-12: Patrons de fòsfor amb els reactius A i B de la reacció de color (blanc, 1ppm, ppm, 4ppm i 10ppm)

Lectura de patrons i mostres

Els tubs d'assaig es portaven a llegir la seva absorbància al colorímetre. Primerament es configurava l'aparell per a que mesures a 660nm . A continuació es seleccionava l'opció per a que mesures l'absorbància. S'introduïa el tub d'assaig amb el blanc i es premia el boto "0%A" per a que el colorímetre assignes aquest valor com a zero. Seguidament es llegien els diferents patrons per duplicat, es feia una mitjana dels 2 resultats i s'anotava la lectura per a poder representar la recta al full de càlcul.

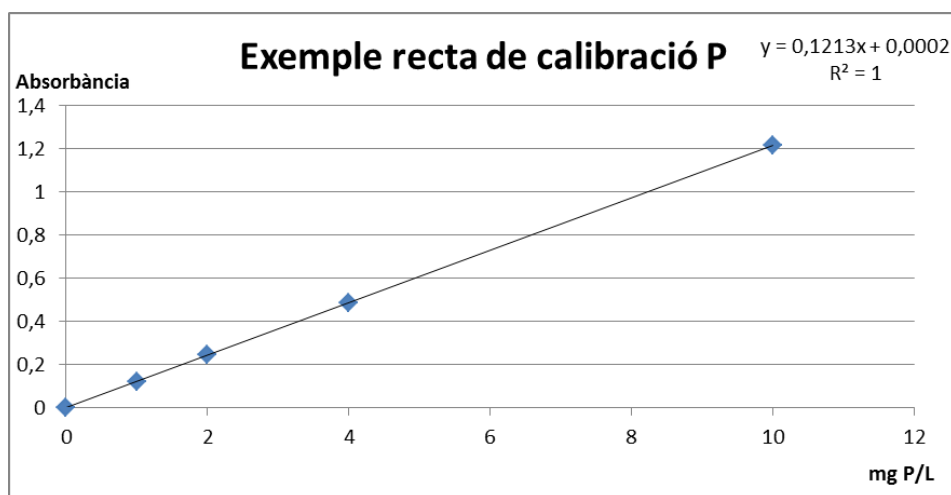


Figura 3.2-13: Recta de calibració del fòsfor

Taula 3.2-2: Valors per a fer la recta de calibració del fòsfor

Patrons(mgP/L)(x)	A (y)
BLANC	0
1	0,1195
2	0,2455
4	0,485
10	1,213

Un cop feta la recta de calibració es podien llegir les mostres per duplicat per a després fer una mitjana i amb el resultat que donava l'aparell i l'equació de la recta es podia arribar a trobar la concentració de P present a les dilucions i per tant a les solucions de cendres. Amb això es podia arribar a saber la concentració de P en la mostra seca. A continuació a les equacions es mostren els càlculs per arribar als mil·ligrams de fòsfor per 100 grams de mostra seca.

Càlculs i expressió de resultats:

Per exemple amb la recta anterior:

Absorbància = $0,1213x + 0,0002$ → si tenim la absorbància de la mostra → concentració de P a la SC diluïda → $x = (A - 0,0002)/0,1213$

$\frac{mgP}{L} SC = \text{concentració de P a la SC diluïda} * \text{factor de dilució}$

$$\frac{mgP}{100g} sms = \frac{mgP}{L} SC * \frac{0.05(L)*100}{Pes\ de\ la\ mostra\ seca\ posat\ a\ calcinar(g)}$$



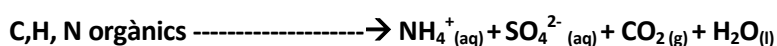
Figura 3.2-14: Mostres de les solucions de cendres diluïdes amb els reactius A i B

3.2.6 Determinació del Nitrogen orgànic (proteïna)

Un altre anàlisi que es va realitzar era el de la determinació del nitrogen orgànic, aquesta determinació es va realitzar amb el mètode clàssic Kjeldhal el qual es divideix en dues etapes: La digestió i la destil·lació-fixació - valoració. El contingut en N-orgànic és una mesura indirecta del contingut en proteïna de l'alga. Si es considera que, com a mitjana, 100 g de proteïna contenen 16 g de N, es pot transformar el contingut de N orgànic en proteïna multiplicant per 6.25.

Digestió

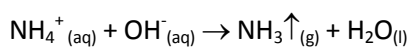
L'objectiu d'aquesta etapa es atacar la mostra amb àcid sulfúric concentrat per a poder mineralitzar el N-orgànic i transformar-lo a N-amoniacal. Es realitza amb l'ajuda d'un catalitzador i calor.



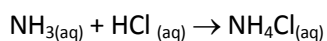
Destil·lació-fixació-valoració

La destil·lació s'inicia amb el desplaçament de l'ió NH_4^+ de la solució problema. L'amoni es desplaçat a amoníac amb un excés de base forta que ens assegura que la reacció sigui completa.

Reacció de desplaçament (RD):

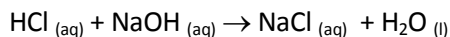


La reacció de fixació de l'amoniac (RF):



Finalment el HCl que ha sobrat de la reacció anterior es valora amb NaOH (volumetria per retrocés) i es dedueix la quantitat d'amoniac, i per tant d'amoni, per diferència.

Reacció de la valoració (RV):



Material i Reactius

- Digestor
- Tubs Kjeldhal
- Destil·lador
- Material de vidre per volumetries
- Paper de fumar
- Balança analítica
- H_2SO_4 concentrat (riquesa=96%p/p ; densitat(p/v)=1,84g/mL)
- Pastilles de Catalitzador Kjeldhal (pes: 4g i composició: 9% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,9%Se)
- NaOH (40%)
- $\text{HCl} \approx 0,1\text{M}$
- NaOH 0,1M normalitzada (el factor es calculava fent una valoració amb HCL comercial exactament 0,1M)
- Roig de metil

Procediment

Digestió

Es pesaven, amb molta precisió uns 0,2500g amb la balança analítica de mostra seca i molturada.

S'embolicava la mostra amb paper de fumar per tal de poder transportar-la fins al tub Kjeldhal i després al digestor. S'introduïa el paquet en el tub Kjeldhal de 100mL i s'hi afegia una pastilla de catalitzador i 7mL de H_2SO_4 concentrat des del dosificador, remenant el tub fins que es mullava tota la mostra. Es posava a digerir tot el contingut del tub Kjeldhal al digestor durant 1 hora a 400°C. Durant aquest procés s'engegava la campana extractora i l'aixeta que hi havia dins la



vitrina ja que es produïen molts vapors de diòxid de sofre , l'aixeta tenia una trompa de buit connectada a una tapa que xuclava i dissolia en aigua part dels vapors generats. La mostra era digerida fins que la solució esdevenia transparent, amb una certa tonalitat verd-blavosa. Finalment es treien els tubs Kjeldhal del bloc del digestor i es deixaven refredar. Per acabar afegíem amb precaució uns 10mL d'aigua destil·lada .



Figura 3.2-15: Mostra d'alga molturada empaquetada dins d'un tub Kjeldahl amb l'àcid sulfúric i el catalitzador



Figura 3.2-16: Mostres en el digestor Kjeldahl

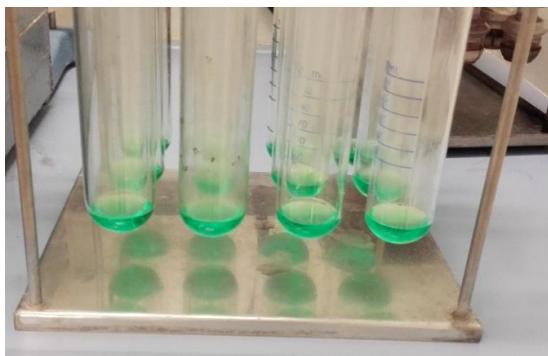


Figura 3.2-17: Tubs Kjeldahl recent trets del digestor

Destil·lació-fixació-valoració

Es preparaven una sèrie d'erlenmeyers (els mateixos que tubs Kjeldhal hi havien) per recollir el destil·lat amb 20mL de HCl (0,1M) i unes gotes de l'indicador roig de meti. Es col·locava l'erlenmeyer a la sortida del destil·lat i a continuació es posava el tub amb el digerit a l'altre extrem del destil·lador. Per iniciar el procés es premia el botó de NaOH per afegir 50mL de NaOH (40%) i finalment es premia el boto per afegir vapor d'aigua per començar la destil·lació. Un cop acabada la destil·lació s'havia de valorar l'excés de HCl que no havia reaccionat amb l' NH_3 contingut al erlenmeyer. S'Agafava l'erlenmeyer on hi havia el destil·lat i es valorava amb NaOH (0,1M) amb factor conegut per tal de neutralitzar l' HCl que no havia reaccionat.



Figura 3.2-18: Mostra en el procés de destil·lació

Estandardització de la solució de HCl aproximadament 0,1M (valoració el blanc)

Abans de realitzar la volumetria de neutralització s'havia de fer una valoració prèvia (per a determinar la concentració exacta d'un dels reactius) que s'anomena blanc. Es pipetejaven en un erlenmeyer 20mL de HCl (0,1M) i s'hi afegien unes gotes de roig de metil. S'omplia la bureta amb NaOH (0,1M) amb factor conegut i es realitzava la valoració. Aquest procés es feia uns 3 cops per tal de obtenir un resultat fiable. El volum consumit en la volumetria de neutralització del destil·lat es restava del volum "blanc" per tal de poder arribar al contingut de amoni que hi havia al tub Kjeldahl. A continuació, a les equacions es mostren els càlculs per arribar al % de nitrogen sms i per arribar al % de proteïna sms.

Càlculs i expressió de resultats:

Volum en mL i pes en g

$$\%N \text{ sms} = \frac{\text{Volum(mL) valoració blanc} - \text{Volum(mL) gastat mostra}}{\text{pes(g) de la mostra posada a digerir}} * f \text{ del NaOH} * 0,14$$

Per a expressar el percentatge de proteïna sobre la mostra seca multiplicàvem per 6,25 el contingut en percentatge de Nitrogen orgànic sobre mostra seca.

$$\%Proteïna = 6.25x\%Norg$$

Com a valor de N total considerem la suma del valor de N orgànic i el N nítric provinent de l'anàlisi dels nitrats.

3.2.7 Determinació del Nitrogen en forma de nitrats

Per últim, un altre anàlisi que es va realitzar, va ser el de la determinació del contingut de nitrogen en forma nítrica. L'anàlisi es basava en la lectura d'una solució que contenia un extracte de la mostra de l'alga mitjançant un elèctrode selectiu de nitrats. La solució extractant contenia àcid sulfàmic que eliminava la interferència dels nitrits, sulfat d'alumini que eliminava la matèria orgànica i àcid bòric que actuava com a conservador. L'elèctrode selectiu de nitrats és de membrana polimèrica (model 9662S7 CRISON) amb escala lineal de treball de 3ppm a 6,2g/l de N-nítric i pendent de $55 \pm 4 \text{ mV}$ a $20 \pm 5^\circ\text{C}$ i es connecta al potenciòmetre junt amb l'elèctrode de referència de Ag/AgCl (model 5044 CRISON).

Material i Reactius

- Solució mare nitrat= 1400ppm N-nítric (10,111g KNO_3 assecats a l'estufa 1h a 110°C enrasats en 1L amb aigua destil·lada) es conservava en petits volums al congelador
- Solució extractant: 17,32g de sulfat d'alumini ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), 1,28g de àcid bòric H_3BO_3 i 2,52g d'àcid sulfàmic $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ es dissolen en 1 litre i s'ajustava el pH a 3 amb NaOH concentrada
- Solució reguladora de força iònica ISA ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M)
- Agitador
- Centrífuga
- Tubs per a la centrifuga
- Elèctrode selectiu de nitrats, elèctrode de referència i potenciòmetre
- Aforats i pipetes

Procediment

Podríem dividir el procés en 3 etapes: Extracció, Calibració i Lectura.



Extracció

Aquesta etapa tenia com a objectiu poder obtenir una solució en la qual hi haguessin tots els nitrats dissolts de una mostra seca la qual havíem pesat prèviament. Es pesaven 0,5 g de mostra seca molturada de els diferents tancs a tubs de centrifuga i a continuació s'afegien 50mL de la solució extractant a cada tub de centrifuga. A continuació es tancaven els tubs i es posaven al agitador durant 30 minuts per tal de que la mostra quedés completament barrejada amb la solució extractant. Un cop passats aquests 30 minuts, es col·locaven els tubs a la centrifuga i aquesta es programava per a girar a 3000 rpm durant uns 10 minuts. Un cop finalitzada la centrifugació es decantava el contingut líquid del tub de la centrifuga amb molt de compte a un vas de precipitats per tal de que el residu que havia quedat centrifugat al fons no s'aboqués al vas de precipitats. Finalment s'afegia 1mL de solució reguladora de força iònica (ISA) a cada vas de precipitats per tal de reduir o minimitzar l'error de les variacions de força iònica entre els patrons i les mostres.

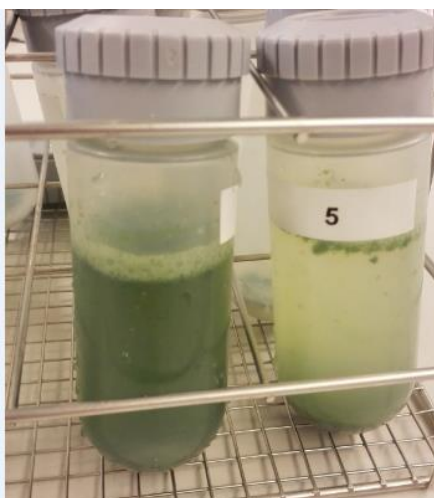


Figura 3.2-19: Mostres als tubs de centrífuga amb la solució extractant.

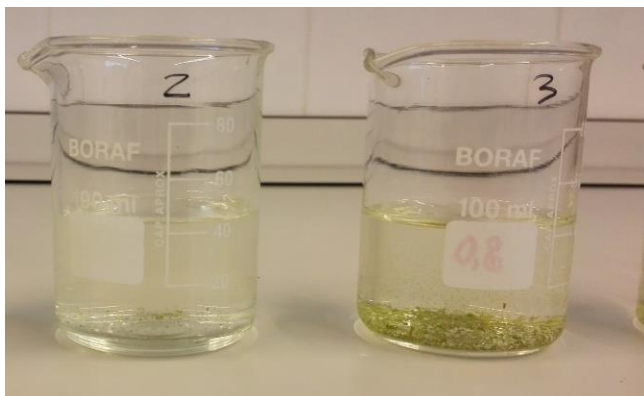


Figura 3.2-20: Extractes de les mostres després de passar per la centrifuga

Calibració

Aquesta etapa era molt important ja que fer la recta patró era necessari per a després poder convertir les lectures de les mostres als valors de concentració que ens interessaven. Es preparaven els patrons de diferents concentracions en matrassos aforats de 50mL. Primerament es pipetejaven 0,5, 1, 2,5 i 5mL de solució mare i s'enrasaven als aforats amb solució extractant. D'aquesta manera s'obtenien patrons de 14, 28, 70 i 140 ppm de N-Nítric. Seguidament s'avocava el contingut de cada aforat en un vas de precipitats i s'afegia 1mL de solució ISA.

D'aquesta manera es podien fer les lectures dels 4 patrons i així obtenir una resposta en mV. Entre patró i patró es rentava amb aigua destil·lada l'elèctrode per tal de no contaminar un patró amb l'altre.

La recta patró es representava la lectura en mV que donava l'elèctrode com a resposta en funció del $\log[\text{ppm}]$ de N-Nítric.

Un cop feta la recta ja es podia començar a llegir les mostres per tal de determinar el contingut en nitrats. La recta per a ser fiable acceptàvem un pendent entre (-51 i -59).

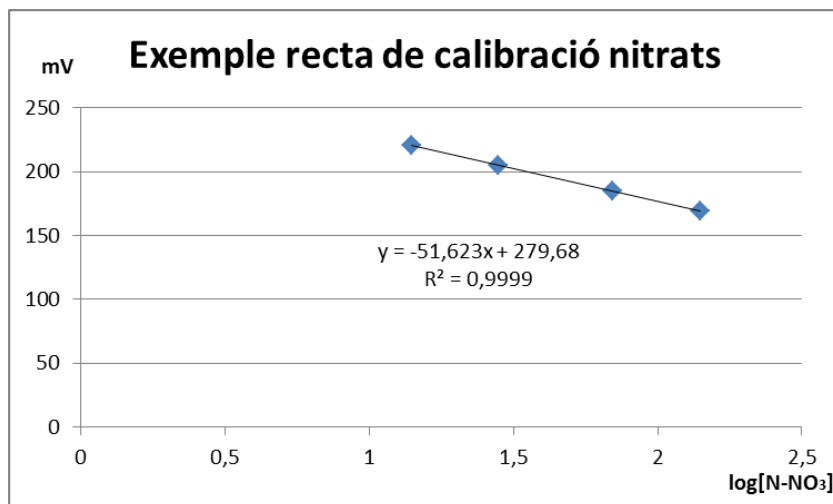


Figura 3.2-21: Recta de calibració de nitrats

Taula 3.2-3: Valors per a fer la recta de calibració de nitrats

[N]	log[N] (x)	mV (y)
14	1,146128036	220,3
28	1,447158031	205,2
70	1,84509804	184,6
140	2,146128036	168,7

Lectura

Es llegia una per una cada mostra de la solució que havíem separat de la centrifugació. Un cop teníem les respostes en mV amb l'equació de la recta patro podíem trobar la concentració de nitrats de la mostra seca. Entre mostra i mostra s'havia de rentar l'elèctrode amb aigua destil·lada per assegurar-nos que no hi havia contaminació entre mostres. A continuació, a les equacions es mostren els càlculs per arribar als mil·ligrams de nitrogen nítric en 100 g sms.

Càlculs i expressió de resultats:

lectura en mV = $-51,623x + 279,68$ → si tenim la lectura en mV d'un extracte →
log de la concentració de nitrats = $(\text{mV} - 279,68) / -51,623$

concentració de nitrats l'extracte $\left(\frac{\text{mgN}}{\text{L}}\right) = 10^{\log \text{concentració}}$

$\frac{\text{mg N nítric}}{100\text{g}} \text{ SMS} = \frac{(\text{concentració de nitrats al extracte } (\frac{\text{mg}}{\text{L}}) * 5)}{\text{pes de la mostra seca al extracte (g)}}$

3.3 Càlculs realitzats

3.3.1 Càlculs de la taxa de creixement (SGR)

Amb les dades de la Taula 3.1-2 es va calcular la taxa de creixement sobre mostra humida (SGR).

$$SGR(\%[dia^{-1}]) = \frac{\ln(\frac{Pf}{Pi})}{t} * 100$$

On: Pf és pes final (alga en una setmana); Pi és pes inicial i t és el temps (7 dies).

3.3.2 Càlcul de l'assimilació de nutrients per part de les algues

Amb el contingut de N i de P de l'alga, es calcula l'assimilació d'aquests dos nutrients per part de l'alga amb l'equació següent

$$Assimilació\ nutrient = \frac{Nti*Wti - Nto*Wto}{increment\ de\ matèria\ seca\ (g)} * 100$$

On Nti és contingut en nutrient de l'alga (mg/g alga) al final de la setmana; Wti, pes de l'alga al final de la setmana (g); Nto, contingut en nutrient de l'alga (mg/g alga) el primer dia de la setmana; Wto, pes de l'alga al primer dia de la setmana (g).

4 Resultats i discussió

4.1 Composició de les algues

Els resultats numèrics de les experiències 1 i 2 d'aquest treball es presenten detalladament a l'annex expressats sobre matèria humida i sobre matèria seca. En els següents apartats es representen gràficament els valors de composició expressats sobre matèria seca de manera que es visualitzi millor els rangs de valors obtingut, l'evolució al llarg del temps i l'efecte de la densitat de cultiu.

4.1.1 Resum de resultats

A la Taula 4.1-1 es mostra la mitjana, el valor màxim, el valor mínim, la desviació i el coeficient de variació de tots els anàlisis realitzats entre la setmana 1 i la setmana 7.

Taula 4.1-1: Mitjana dels valors, valors màxims, mínims i les desviacions (S) amb el coeficient de variació (CV) de tots els resultats dels anàlisis.

	Mitjana (S1-S7)	Mínim	Màxim	S	CV(%)
M.Seca (%)	10,90	9,77	13,20	0,80	7,30
M.mineral (% sms)	24,53	21,43	31,19	2,35	9,57
P (mg/100g sms)	319,35	273,72	444,30	49,90	15,63
N.orgànic (% sms)	3,64	3,30	4,34	0,27	7,28
N.nítric (% sms)	0,18	0,10	0,31	0,06	31,07
N.total (% sms)	3,79	3,38	4,46	0,28	7,37
Proteïna (% sms)	22,77	20,63	27,13	1,66	7,28

Per al contrast dels valors obtinguts amb els valors bibliogràfics sobre composició de macroalgues hem fet servir les referències bibliogràfiques de treballs similars a aquest on es dona la composició de diferents *Ulva spp* que es mostra en la Taula 4.1-2.

Taula 4.1-2: Recerques bibliogràfiques de treballs similars amb algues del gènere *Ulva* els seus resultats

Autor	Observacions	Espècie	MS	% MM sms	% P sms	% N sms	%Proteïna sms
(Mata et al., 2016)	tancs de 10000L interiors	<i>Ulva ohnoi</i>		24,5-39,5%		3,3-4,7%	13,30%
(Angell et al., 2014)	tancs al aire lliure	<i>Ulva ohnoi</i>				1-3,5%	
(Ben-Ari et al., 2014)	tancs exteriors de 10m x 2m	<i>Ulva lactuca</i>		17-22%	0,5-0,9%	3,3-5,6%	20,8-35%
(Tabarsa et al., 2012)	laboratori	<i>Ulva lactuca</i>	5,96%	18,03%			10,69%
(Msuya & Neori, 2010)	tancs al aire lliure	<i>Ulva lactuca</i>	10-11,6%	19,9-22,1%	0,18-0,37%		15,3-27%
(Msuya & Neori, 2008)	tancs exteriors 1 m diàmetre	<i>Ulva lactuca</i>	9,6-14,4%	15,7-28,1%	0,15-0,76%		14,2-44,3%
(Naldi & Wheeler, 1999)	laboratori	<i>Ulva fenestrata</i>	18,50%			2,4-4,7%	
(Villares et al., 1999)	rias de galícia	<i>Ulva sp.</i>			0,025-0,23%	0,7-5,1%	

Pel que fa al contingut en matèria seca el ventall de valors oscil·la entre 9.77% i 13.20%. Aquests valors estan al voltant del 10 % durant tot l'experiment. Pel que fa a la bibliografia trobada, Msuya & Neori(2008) van observar un percentatge de matèria seca amb *Ulva lactuca* entre 9.6% i 14.4%. Msuya & Neori (2010) van fer un altre estudi amb *Ulva lactuca* en el qual van trobar un contingut de matèria seca entre 10.0% i 11.6%. Aquesta macroalga es del mateix gènere que la *Ulva ohnoi* per tant els nostres valors estan dintre dels valors trobats a la bibliografia. Concretament en *U.ohnoi*, Mata *et al.* (2016) trobaren uns valors de matèria seca d'un 13%.

Si mirem el contingut de matèria mineral, el ventall de valors oscil·la entre 21.43% i 31.19% sms. Segons Mata *et al.* (2016) en un altre estudi fet amb *Ulva ohnoi* es va trobar un percentatge de matèria mineral entre 24.5% i 33.1% sms cosa que indica que els nostres resultats estan també dins dels valors obtinguts en altres estudis. Amb l'estudi fet amb *Ulva lactuca* per Msuya & Neori (2010) es va observar un contingut de matèria mineral entre 19.9% i 22.1% sms.

En referència al contingut en fòsfor, els valors que hem trobat oscil·len entre 273.7 mg P/100g mostra seca i 444.3 mg P/100g mostra seca el que equival a 0.273% i 0.444% sms. Segons Msuya & Neori (2008) amb *Ulva lactuca* es va trobar un contingut de fòsfor entre 0.15% i 0.76% sms amb unes condicions molt variables. Msuya & Neori (2010) van trobar en un altre experiment amb *Ulva lactuca* un contingut de fòsfor entre un 0.18% i un 0.37% sms.

Mirant al contingut en nitrogen, pel que fa al nitrogen orgànic, trobem un ventall de valors que oscil·la entre 3.3% i 4.34% sms. Mata *et al.* (2016) van trobar a *Ulva ohnoi* un contingut de nitrogen total (suma de nitrogen nítric i nitrogen orgànic) d'entre un 3.3% i un 4.7% sms. La majoria de nitrogen total esta format per nitrogen orgànic per la qual cosa els valors obtinguts en el nostre experiment estarien dintre dels valors bibliogràfics. També es van trobar amb *Ulva*

lactuca cultivava amb diferents règims d'aeració uns continguts de nitrogen orgànic de entre 3.3% i 5.6% sms (Ben-Ari *et al.* 2014).

Del contingut de nitrogen nítric hem trobat un ventall de valors que oscil·la entre 0.1% i 0.308% sms. Si sumem els valors de nitrogen nítric i nitrogen orgànic obtenim un ventall de valors entre 3.38% i 4.46% sms. Aquests valors farien referència al contingut de nitrogen total sobre mostra seca i cal remarcar que en els diferents estudis que s'han trobat, el contingut de nitrogen en forma nítrica no és gaire habitual fer-lo, ja que normalment es un percentatge bastant baix, tot i que si l'aport de nitrogen majoritari és en forma de nitrat (com és el cas dels experiments explicats en aquest TFG) s'ha vist que el contingut en nitrat de l'alga augmenta (Naldi & Wheeler, 1999).

Mirant els límits establerts per el (reglament (UE) 1258/2011) en referència al contingut màxim de nitrats en els productes alimentaris podem assegurar-nos que les algues d'aquest estudi no sobrepassen els límits establerts de entre 0.275% de nitrogen nítric sms i 0.688% de nitrogen nítric sms.

Els continguts de proteïna es van calcular multiplicant per 6.25 el percentatge de nitrogen orgànic obtingut per el mètode Kjeldhal. Hem obtingut uns resultats que oscil·len entre 20.6% i 27.13% de proteïnes sobre mostra seca.

Si mirem la Taula 4.1-1 i observem el coeficient de variació (%), tenim com a variable més estable al contingut de nitrogen orgànic sms. Com a variable més dispersa tenim el contingut de nitrogen nítric sms, aquest anàlisi es el que ha donat resultats mes dispersos de tots en aquest treball.

4.1.2 Evolució en el temps

A continuació hi ha 7 gràfiques Figura 4.1-1, Figura 4.1-2, Figura 4.1-3, Figura 4.1-4, Figura 4.1-5, Figura 4.1-6 i Figura 4.1-7 que representen per setmanes els resultats de totes les anàlisis per ambdós experiments. Tots el resultats (excepte la matèria seca) s'expressen sobre matèria seca (sms) i les desviacions estàndard (barres d'error) són les obtingudes de l'anàlisi de les 3 o 4 rèpliques de l'anàlisi fetes per cada mostra.





Figura 4.1-1: Composició en matèria seca de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)

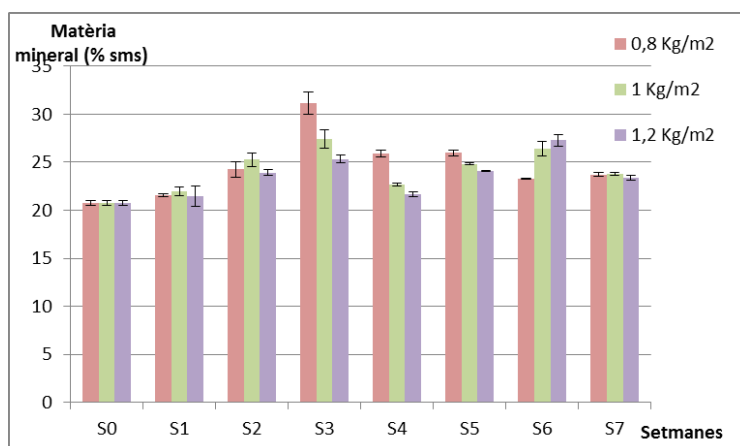


Figura 4.1-2: Composició en percentatge de matèria mineral de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.

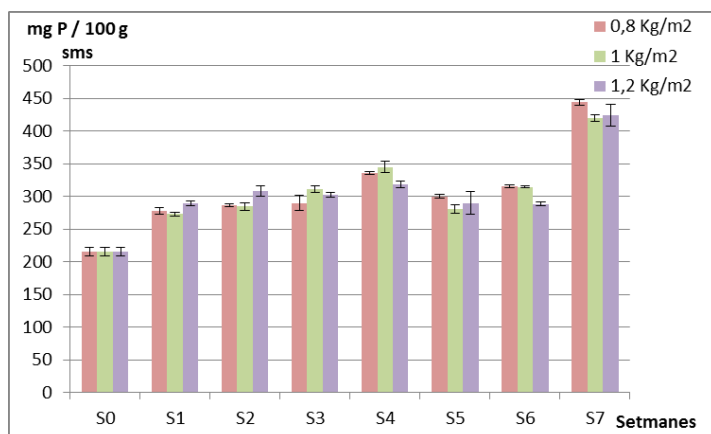


Figura 4.1-3: Composició en mg/100g de fòsfor de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.

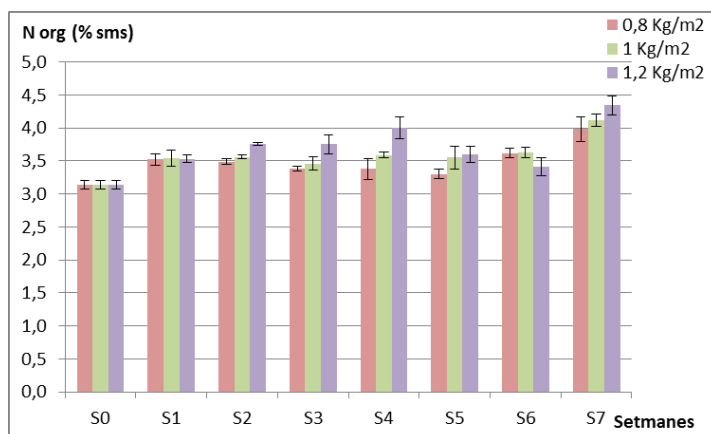


Figura 4.1-4: Composició en percentatge de nitrogen orgànic de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.

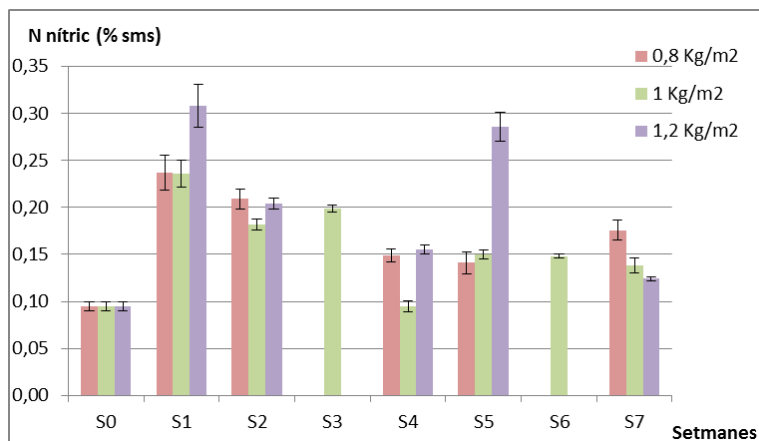


Figura 4.1-5: Composició en percentatge de nitrogen nítric de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2). Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre les diferents contramostres del mateix tanc que s'han analitzat.

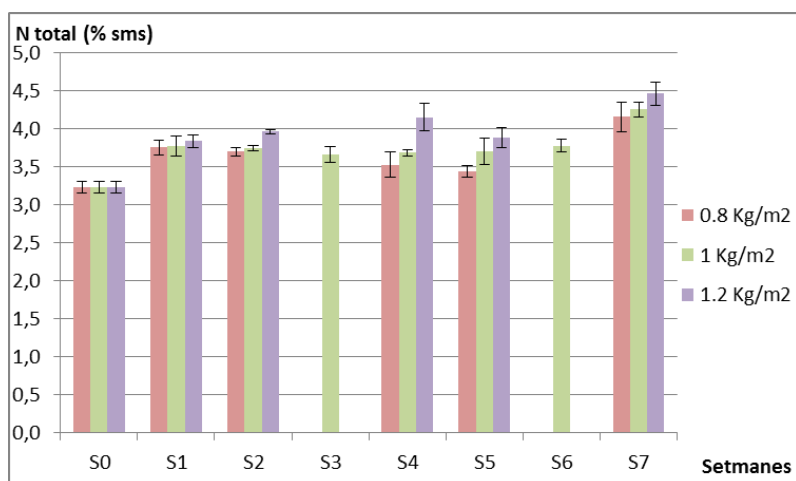


Figura 4.1-6: Composició en percentatge de nitrogen total de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)

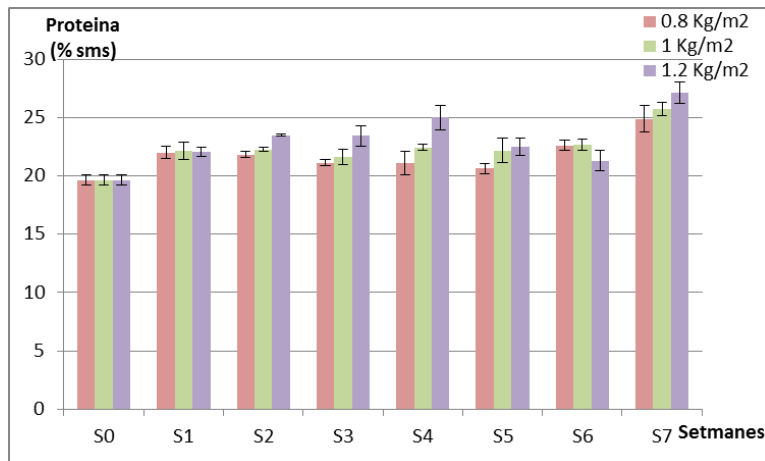


Figura 4.1-7: Composició en percentatge de proteïna de les mostres d'algues provinents dels 3 tancs amb diferents densitats de cultiu durant 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)

Si analitzem l'evolució al llarg de les 7 setmanes de experiment no s'han apreciat canvis importants en relació al contingut de matèria seca al llarg del temps. En referència a les ultimes setmanes, la 6 i la 7 que son les que tenien uns cabals diferents que les 5 primeres tampoc s'ha apreciat cap diferència important. En el tanc R1 (0.8 Kg/m^2) el poc augment en la concentració d'àcid que arribava des de l'aigua dels peixos sembla que no ha tingut quasi res d'efecte en el contingut de matèria seca de les setmanes 6 i 7. En el tanc R2 (1 Kg/m^2) amb l'augment del cabal (de 4 L/h a 5 L/h) d'aigua dels peixos que arribava al tanc i el petit augment de la concentració d'àcid sembla que ha influït en que el contingut de matèria seca disminueixi lleugerament. I finalment en el tanc R3 (1.2 Kg/m^2), com al R2 l'augment de 4 L/h a 6 L/h del cabal d'aigua dels peixos ha fet que el contingut de matèria seca disminueixi.

Pel que fa al contingut de matèria mineral, al llarg del experiment s'ha pogut observar que hi ha hagut una certa tendència creixent al llarg del temps però en general han sigut uns valors força constants durant les 7 setmanes. A excepció de la setmana 3 en la qual hi ha agut un pic considerable en els 3 tancs. El petit augment de la concentració d'àcid a l'aigua dels peixos i l'augment del cabal que prové del tanc dels peixos al tanc R2 i R3 sembla que no ha tingut gaire efecte en el contingut de matèria mineral. A la setmana 6, als 3 tancs s'aprecia com els nivells canvien una mica respecte a les primeres 5 setmanes, però a la següent setmana, la 7, els nivells tornen mes cap a la tendència de les primeres 5 setmanes. A vegades les algues tenen un període

d'adaptació quan les condicions del medi canvien i les seves composicions es veuen afectades per aquest període d'adaptació, es molt probable que amb la matèria mineral hagi passat això (Barr, 2007).

En referència al contingut de fòsfor, si mirem en relació al llarg de les 7 setmanes de experiment podem veure com es segueix una certa tendència creixent, la setmana 0 té uns nivells molt baixos ja que vam iniciar l'experiment amb una barreja d'*Ulva ohnoi* la qual havia sigut cultivada una gran amb unes condicions diferents i per tant el seu contingut nutricional es mes pobre. Però es pot veure com a la ultima setmana hi ha hagut un augment considerable en el contingut de fòsfor. Es va observar un augment del contingut de fòsfor amb els 3 tancs s'ha vist un fort augment a la ultima setmana(7). Durant la setmana 6 els nivells es van mantenir molt constants respecte a les 5 primeres setmanes, fet que tornaria a fer pensar en el període d'aclimatació esmenat anteriorment.

Pel que fa al contingut de nitrogen orgànic mirant l'evolució al llarg del temps es pot observar com els nivells es mantenen bastant constants amb un lleuger augment a la ultima setmana. Aquest augment i l'augment del fòsfor podrien estar relacionats, ja que el nitrogen i el fòsfor formen part de les cèl·lules, en aquest cas, de les cèl·lules de les algues. Igual que amb el contingut de fòsfor, el contingut de nitrogen orgànic sobre mostra seca ha augmentat en els 3 tancs notablement a la setmana 6 i 7.

Observant el contingut de nitrogen nítric durant les setmanes que duren els experiments es van observar resultats força dispersos i no es veu una tendència clara al llarg de les primeres 5 setmanes. A la setmana 6 i 7 sembla que els nivells baixen una mica. Tot i això els valors obtinguts, s'acosten als donats per Naldi & Wheeler (1999) en *Ulva fenestrata*. La majoria de resultats trobats de composició d'algues no analitzen el contingut en N nítric, donat que solen ser experiències en que l'aport de nitrogen es fa amb amoni (i no amb nitrat com en aquest TFG) i a baixes concentracions.

Pel que fa al contingut en nitrogen total, que és la suma de nitrogen orgànic i nitrogen nítric, podem observar com es segueix una petita tendència a l'alça, però com que la proporció de nitrogen nítric es molt petita, pràcticament no hi ha diferències a destacar en comparació amb el percentatge de nitrogen orgànic

Malauradament cal remarcar que van haver-hi problemes durant les setmanes 3 i 6 i les anàlisis relacionades amb el contingut de nitrogen nítric no es van poder fer correctament, per això a la Figura 4.1-5 i a la Figura 4.1-6 no hi apareixen les dades de nitrogen nítric aquestes 2 setmanes. Van haver-hi problemes amb la recta de calibració de l'elèctrode i per tal de minimitzar l'error es van tornar a repetir únicament per a les algues del tanc R2 que conté una densitat de cultiu de 1 Kg/m² ja que es va observar que els resultats eren molt estables entre els diferents tancs.

Fent una valoració general de la variació amb el temps i dels resultats, de forma resumida tenim que hi ha hagut molt poca variació entre setmanes en totes les anàlisis, tots els valors són més alts que els de les algues de partida (S0), el màxim a la setmana 3 del contingut en matèria mineral, els màxims de nitrogen i fòsfor a la setmana 7 i que els nitrats es la variable que s'ha comportat de forma més erràtica durant les setmanes de cultiu.

4.1.3 Efecte de la densitat de cultiu

Amb tot això i creient que les algues necessiten una setmana d'aclimatació al nou medi per a poder mostrar la composició real (Barr, 2007), s'ha cregut que el més adient era descartar els resultats del segon experiment per que no serien del tot fiables, i també, descartar els resultats de la setmana 1. Per tant ens centrarem en analitzar l'efecte de la densitat de cultiu en els resultats entre la setmana 2 i la setmana 5 (quan les algues estaven aclimatades a unes certes condicions de llum i aport de nutrients).

A continuació hi ha una sèrie de gràfiques Figura 4.1-8, Figura 4.1-9, Figura 4.1-10, Figura 4.1-11, Figura 4.1-12, Figura 4.1-13 i Figura 4.1-14 que representen les mitjanes de la setmana 2 a la setmana 5 de totes les anàlisis realitzats per veure l'efecte de la densitat de cultiu en la composició. Les barres d'error representen la desviació estàndard de la mitjana.



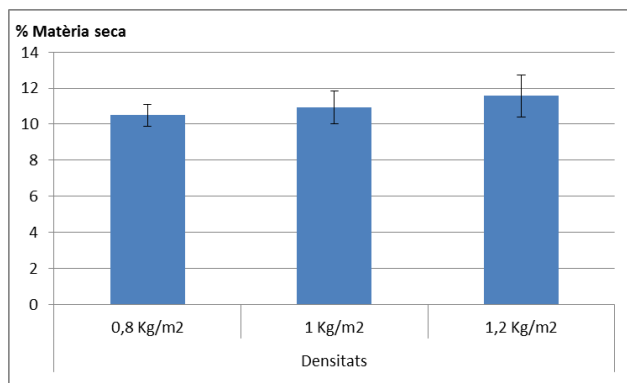


Figura 4.1-8: Composició en matèria seca (%) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

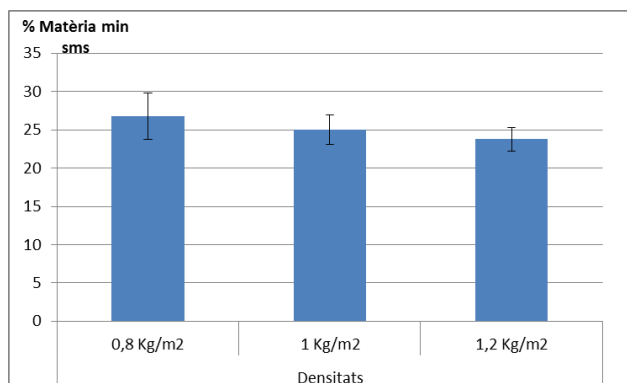


Figura 4.1-9: Composició en matèria mineral (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

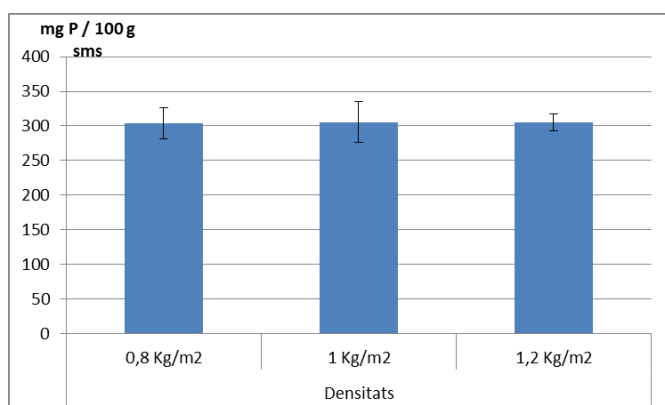


Figura 4.1-10: Composició en fòsfor (mg P/100g sms) de les algues cultivades a diferents densitats de cultiu. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

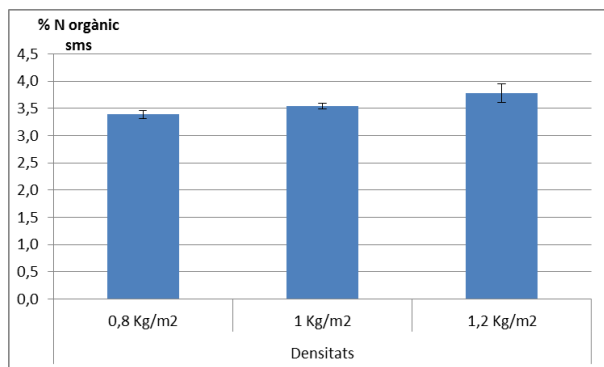


Figura 4.1-11: Composició en nitrogen orgànic (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

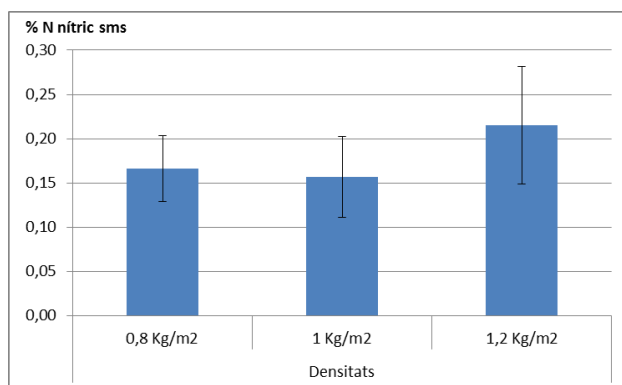


Figura 4.1-12: Composició en nitrogen nítric (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

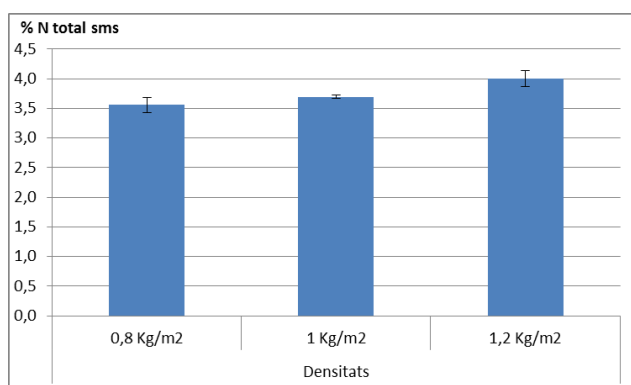


Figura 4.1-13: Composició en nitrogen total (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

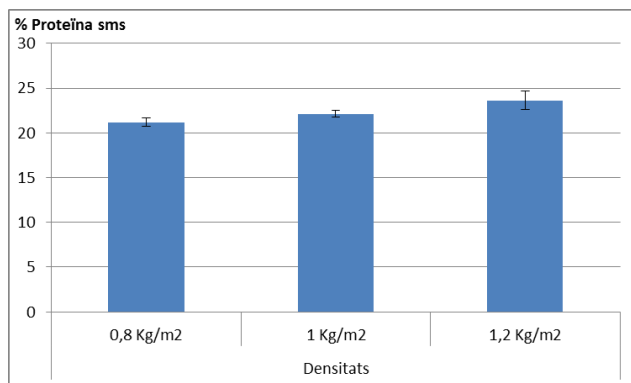


Figura 4.1-14: Composició en proteïna (% sms) de les algues cultivades a diferents densitats. Valors promig de les setmanes 2 a 5 (experiment 1).

Si analitzem la mitjana del contingut de matèria seca entre les setmanes 2 i 5, veiem que l'efecte densitat té una mica d'incidència. El tanc R3, que es el que conté una major densitat de cultiu (1.2 Kg/m^2), durant aquestes quatre setmanes ha sigut el que ha tingut un contingut de matèria seca més elevat. Per tant es veu com a més densitat de cultiu més tendència a augmentar el contingut en matèria seca de les algues.

Pel que fa al contingut de matèria mineral es pot observar com hi ha una certa tendència de que a més densitat de cultiu, menys contingut en matèria mineral, les diferències no van ser significatives.

En referència al contingut de fòsfor no s'aprecia cap evidència que mostri que un tanc hagi obtingut nivells més alts, cosa que indica que no se segueix cap patró ni cap tendència durant les setmanes mes estables del experiment. Per tant, amb les densitats de cultiu treballades, no sembla que el contingut en fòsfor variï en funció de la densitat de cultiu.

Pel que fa al contingut de nitrogen orgànic, mirant la mitjana entre les setmanes 2 i 5 es pot observar una clara tendència de que les algues del tanc amb R3 que té la major densitat de cultiu (1.2 Kg/m^2) siguin les que tinguin un major contingut en nitrogen orgànic. Per tant podríem corroborar que a major densitat de cultiu, major contingut en nitrogen a l'alga, tal i com alguns autors apunten (Angell *et al.* 2014).

Observant el contingut de nitrogen nítric no es veu cap tendència clara pel que fa a les densitats. La gràfica que representa la mitjana d'aquestes setmanes amb les diferents densitats de cultiu

mostra unes desviacions molts altes atribuïbles a les importants oscil·lacions temporals que hem vist anteriorment.

El contingut de nitrogen total podem observar com la tendència ha sigut molt similar a la del nitrogen orgànic donat el seu pes en el contingut total de nitrogen i de la petita proporció que té el nitrogen nítric en aquest total.

Com a resum podríem dir que les algues cultivades a la densitat més alta presenten més matèria seca i la matèria seca és més rica en contingut proteic i menys en nutrients minerals que les algues provinents del cultiu a densitat inferiors.

4.2 Extracció de nutrients

En aquest apartat analitzaré les dades del creixement de les algues i les de l'assimilació de nutrients d'aquestes.

4.2.1 Creixement

A continuació a la Taula 4.2-1 figuren les dades de creixement de la Taula 3.1-2 però transformades a matèria seca.

Taula 4.2-1: Pesos, augment de pes obtinguts i SGR sms cada setmana (Font: Klimaitis, 2016)

	Pes (g) inicial alga en MS			Pes (g) alga final 1 setmana en MS			creix (▲ Pes (g) MS)			creix (▲ Pes MS (g) /dia)			SGR (%dia-1)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
S1	29,06	35,09	42,11	52,14	58,37	53,95	23,08	23,27	11,83	3,30	3,32	1,69	8,35	7,27	3,54
S2	29,20	37,95	42,28	59,96	66,83	73,50	30,76	28,88	31,22	4,39	4,13	4,46	10,28	8,08	7,90
S3	29,50	38,94	50,70	57,33	62,87	85,02	27,82	23,93	34,33	3,97	3,42	4,90	9,49	6,84	7,39
S4	28,72	34,68	42,33	55,03	55,91	71,37	26,32	21,23	29,05	3,76	3,03	4,15	9,29	6,82	7,46
S5	27,16	34,22	44,31	49,00	55,23	70,15	21,83	21,01	25,84	3,12	3,00	3,69	8,43	6,84	6,56
S6	25,89	31,90	40,36	45,12	59,64	66,83	19,23	27,74	26,47	2,75	3,96	3,78	7,93	8,94	7,21
S7	26,59	33,58	42,18	44,76	50,28	59,58	18,17	16,70	17,40	2,60	2,39	2,49	7,44	5,77	4,93

Creix = creixement.



A continuació hi ha els gràfics corresponents al creixement de matèria seca i SGR Figura 4.2-1 i Figura 4.2-2

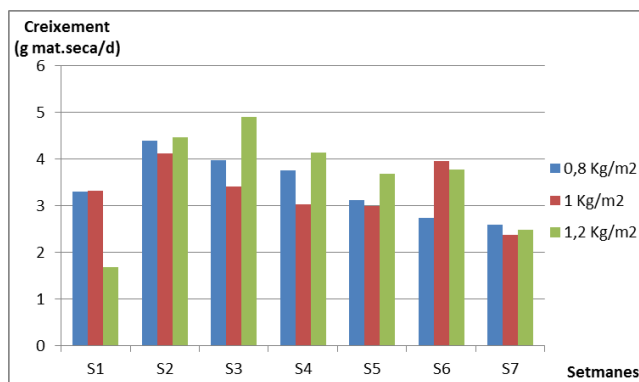


Figura 4.2-1: Creixement expressat en increment de grams de matèria seca per dia durant les 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)

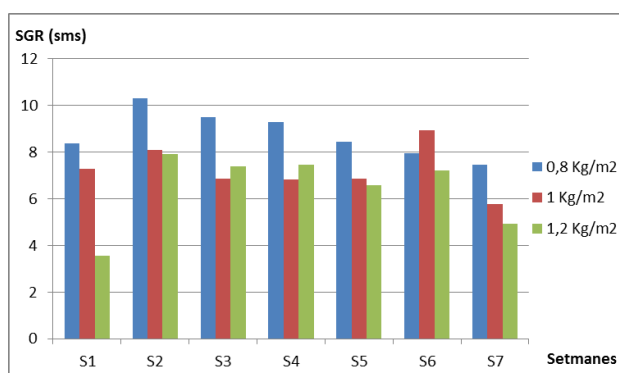


Figura 4.2-2: Taxa de creixement (SGR sms) durant les 7 setmanes (experiment 1 i experiment 2)

El creixement expressat en increment de grams de matèria seca per dia s'ha mantingut entre valors de 1.7 g de matèria seca/dia i 4.9 g de matèria seca/dia, al llarg de les 7 setmanes d'experiments. Aquests valors significarien uns resultats de 5.3 g de matèria seca/dia/m² i 15.5 g de matèria seca/dia/m². Aquesta conversió s'ha fet per a comparar-la amb els resultats de Mata *et al.* (2016) que van trobar a la mateixa espècie *Ulva ohnoi* uns valors de creixement de entre 17.2 g de matèria seca/dia/m² i 46.3 g de matèria seca/dia/m² amb unes altres condicions de cultiu (densitat de 0.6 Kg/m², cultiu exterior (llums solar) i concentració d'aigua d'entrada als tancs d'algues de 10 mg/L de nitrogen i de 2 mg/L de fòsfor).

En relació al SGR sms o taxa específica de creixement sms s'han vist uns valors de entre 3.5% i 10.3%. Angell *et al.* (2014) van trobar uns valors de SGR de entre 2% i 11.7% amb l'espècie *Ulva ohnoi*.

Si ens fixem en l'efecte de la densitat de cultiu en la taxa específica de creixement (SGR) però només entre les setmanes 2 i 5 sembla que la densitat de cultiu sí que influeix d'alguna manera, ja que els tancs amb més densitat de cultiu sempre han tingut valors de SGR més baixos. La disminució de la taxa de creixement al augmentar la densitat de cultiu ha estat descrita per altres autors treballant amb diferents algues (*Porphyra dioica*) Pereira *et al.* (2006).

4.2.2 Assimilació de nutrients

A continuació hi ha les gràfiques Figura 4.2-3, Figura 4.2-4 i Figura 4.2-5 que ens indiquen el creixement net dels nutrients (matèria mineral, fòsfor i nitrogen).

Es calculen segons l'equació:

$$\text{creixement} = (N_{ti} * W_{ti} - N_{to} * W_{to})$$

On N_{ti} és contingut en nitrogen de l'alga (mg/g alga) al final de la setmana; W_{ti} , pes de l'alga al final de la setmana (g); N_{to} , contingut en nitrogen de l'alga (mg/g alga) el primer dia de la setmana; W_{to} , pes de l'alga al primer dia de la setmana (g).

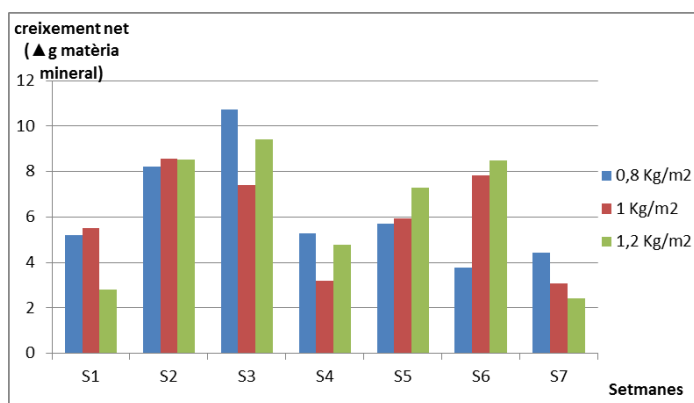


Figura 4.2-3: Increment net de matèria mineral de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu.

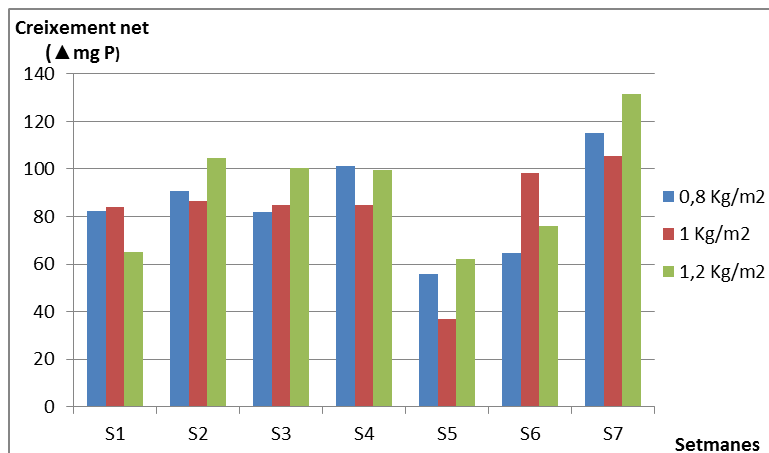


Figura 4.2-4 Increment net de fòsfor de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu.

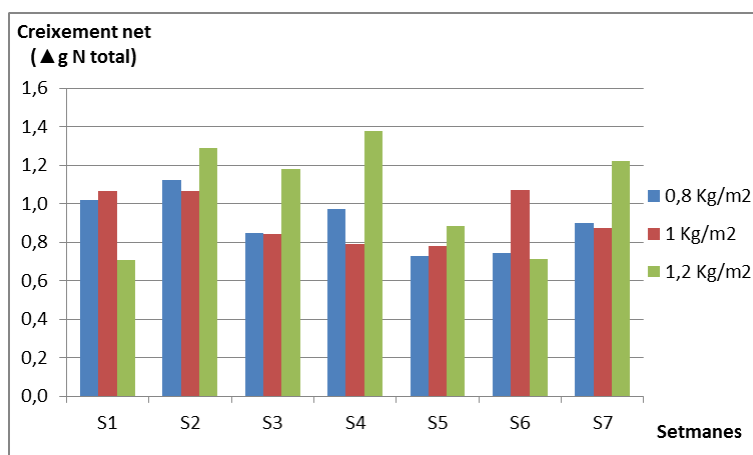


Figura 4.2-5: Increment net de nitrogen de totes les setmanes amb les diferents densitats de cultiu.

El creixement de matèria mineral està entre els 2 grams per setmana i els 10 grams per setmana. En general no es veu una tendència clara al llarg de les 7 setmanes ja que hi ha hagut molts alts i baixos amb un pic a la setmana 3. Pel que fa a la densitat de cultiu tampoc es pot observar si hi ha alguna tendència, ja que en algunes setmanes hi ha més augment de matèria mineral al tanc amb menys densitat de cultiu (0.8 kg/m^2) i en altres, hi ha més creixement en el que més (1.2 kg/m^2). El canvi de condicions a la setmana 6 sembla que ha fet disminuir el creixement net en matèria mineral a la setmana 7.

Pel que fa al creixement net de fòsfor està entre 40 mg per setmana i 130 mg per setmana. En aquest cas al llarg de les set setmanes sembla que s'han mantingut uns nivells mes constants que amb la matèria mineral al voltant de 80 mg per setmana per igualment no es veu una tendència clara. Si mirem la diferència entre densitats de cultiu en quatre de les set setmanes hi ha hagut més creixement en el tanc R3 (1.2 kg/m²). El canvi de condicions a la setmana 6 ha fet augmentar en general el creixement en els 3 tancs.

En relació al creixement net de nitrogen, el rang de valors es situa entre 0.6 grams per setmana i 1.3 grams per setmana. Al llarg de les set setmanes s'han mantingut els valors bastant constants al voltant dels 0.8 grams a excepció d'algun pic al tanc R3 (0.8 kg/m²) en algunes setmanes. Si mirem la diferència entre densitats de cultiu, aquests pics semblen indicar que a major densitat de cultiu més creixement net en nitrogen. El canvi de condicions de cultiu no sembla haver alterat notablement el creixement net de nitrogen.

A continuació hi han les gràfiques Figura 4.2-6, Figura 4.2-7 i Figura 4.2-8 que ens indiquen el percentatge d'increment de cada nutrient respecte a l'increment de matèria seca.

Es calculen mitjançant la formula de l'equació:

$$\text{Assimilació nutrient (creixement relatiu)} = \frac{N_{ti} * W_{ti} - N_{to} * W_{to}}{\text{increment de matèria seca (g)}} * 100$$

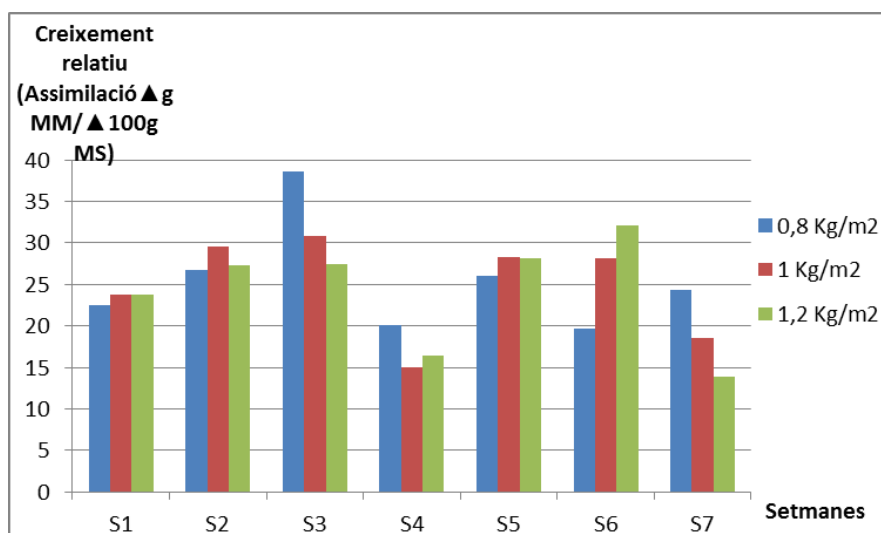


Figura 4.2-6: Assimilació de matèria mineral de les algues durant els 2 experiments

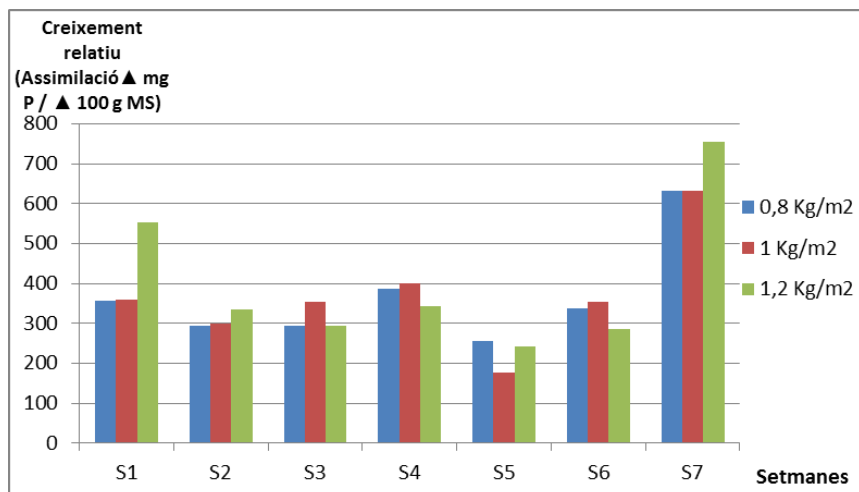


Figura 4.2-7 : Assimilació de fòsfor de les algues durant els 2 experiments

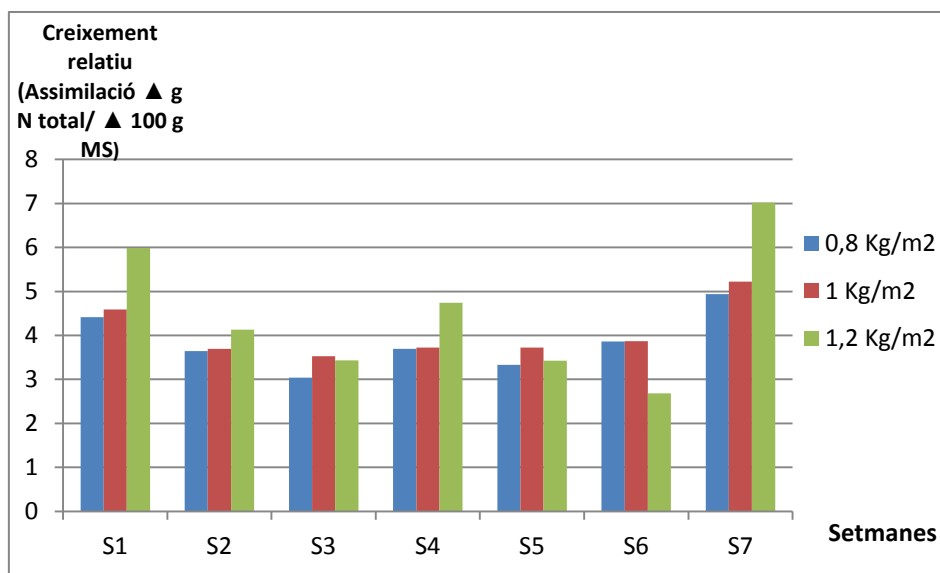


Figura 4.2-8: Assimilació de nitrogen total de les algues durant els 2 experiments

L'assimilació de matèria mineral està entre un rang de valors de 15% i 40%, amb un pic a la setmana 3 i una baixada brusca a la setmana 4. Malgrat això, els valors s'han mantingut al voltant del 25% durant totes les setmanes del experiment. Entre densitats de cultiu no es pot apreciar cap tendència clara per a veure si influeix, i mirant les últimes 2 setmanes en les que es van canviar de condicions es veu una petita baixada sobretot a la setmana 7.

L'assimilació de fòsfor esta entre 0.2% i 0.8%. Si mirem l'evolució durant les set setmanes hi ha un pic a la última setmana per a les altres els valors s'han mantingut bastant constants, al voltant de 0.3%. Al igual que amb la matèria mineral, entre densitats de cultiu no es veu cap tendència clara. I amb les ultimes 2 setmanes que és quan hi ha hagut el canvi de condicions, a la setmana 7 com he dit anteriorment, hi ha un pic considerable en els 3 tancs.

Pel que fa a l'assimilació de nitrogen, el rang de valors es situa entre 3% i 6.5%. Generalment els valors s'han mantingut molt estables durant tot l'experiment al voltant del 3.5% menys a la ultima setmana que com amb el fòsfor hi ha hagut un pic. Si mirem la diferencia entre densitats de cultiu, sembla que a mes densitat, mes percentatge d'assimilació de nitrogen.

Per tant podem dir que a més densitat de cultiu, menys taxa de creixement, però més contingut de proteïna tindrà l'alga. Aquest fet ha estat demostrat en altres estudis fets en *Ulva* (*U. Fasciata*, Lapointe & Tenore, 1981; *Porphyra dioica*, Pereira *et al.* 2006; *U. Ohnoi*, Angel *et al.* 2014).

D'altra banda a més densitat de cultiu hi haurà més competència per la llum, i alguns autors també han demostrat que les algues que reben menys llum tenen taxes de creixement més baixes i continguts en nitrogen més alts (*Ulva sp*, Duke *et al.* 1986; *Ulva sp*, Villares *et al.* 1999; *Ulva ohnoi*, Barr, 2007). Per tenir una visió més clara de l'efecte de la densitat de cultiu presentem a continuació a les taules: Taula 4.2-2, Taula 4.2-3 i Taula 4.2-4 s'observen les mitjanes i les desviacions estàndard de l'assimilació en matèria mineral, fòsfor i nitrogen de les setmanes 2, 3, 4 i 5 on les condicions experimentals han estat més constants.

Taula 4.2-2: Mitjana i desviació de l'assimilació en matèria mineral de les algues entre la setmana 2 i 5

Densitat kg/m ²	$\Delta g \text{ MM} / \Delta 100g \text{ MS}$	sd
0,8	26,21	7,74
1	25,38	7,38
1,2	24,81	5,64

Taula 4.2-3 Mitjana i desviació de assimilació en nitrogen total de les algues entre la setmana 2 i 5

Densitat kg/m ²	ΔN total/ $\Delta 100$ gMS	sd
0,8	3,43	0,30
1	3,67	0,10
1,2	3,93	0,63

Taula 4.2-4 Mitjana i desviació de l'assimilació en fòsfor de les algues entre la setmana 2 i 5

Densitat kg /m ²	Δ mg P/ $\Delta 100$ g MS	sd
0,8	306,12	54,87
1	305,33	96,60
1,2	302,85	46,71

Podem veure que els valors de les desviacions estàndards no permeten visualitzar diferències entre les mitjanes i per tant semblaria que l'assimilació d'aquests nutrients per part de l'alga no depèn de la densitat amb què es cultiva.

5 Conclusions

Dels resultats anteriors i tenint en compte els objectius plantejats inicialment podem dir que:

1. Pel que fa a la variació amb el temps, hi ha hagut poca diferència en els resultats de composició de les algues obtingudes, si no tenim en compte les algues de partida que venien d'unes altres condicions totalment diferents.
2. Les algues cultivades a més alta densitat presentaven més matèria seca i aquesta matèria seca era més rica en proteïnes i menys rica en nutrients minerals.
3. Contràriament, l'assimilació en matèria mineral, nitrogen i fòsfor sembla que no es veu afectada per la densitat de cultiu.
4. També s'ha vist que a més densitat de cultiu, menys taxa de creixement (SGR) i com a conseqüència les algues presentaven un contingut superior en proteïna.
5. En relació a la modificació dels cabals i del canvi de pH (tot i que només tenim dades de dues setmanes) tant la composició com l'assimilació en nitrogen i fòsfor té tendència a augmentar.
6. Com a últim, podríem dir que la majoria dels resultats referents a la composició estan d'acord amb els valors trobats a la bibliografia.
7. Finalment cal recordar que les algues cultivades en aquest treball no superen les dosis màximes de nitrats recomanats en vegetals per la Unió Europea per a poder se utilitzades com a aliment.

6 Bibliografia

1. Aguila-Ramírez, R. N., Casas-Valdez, M., Hernández-Guerrero, C. J., & Marín-Álvarez, A. (2005). Biomasa de *Ulva* spp.(Chlorophyta) en tres localidades del malecón de la Paz, Baja California Sur, México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 40(1), 55-61.
2. Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Dominguez, S., González-Acosta, B., & Pérez-Gil, F. (2005). Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *Journal of food composition and analysis*, 18(1), 79-88.
3. Amosu, A. O., Robertson-Andersson, D. V., Kean, E., Maneveldt, G. W., & Cyster, L. (2016). Biofiltering and Uptake of Dissolved Nutrients by *Ulva armoricana* (Chlorophyta) in a Land-based Aquaculture System. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(2), 298-304.
4. Angell, A. R., Mata, L., Nys, R., & Paul, N. A. (2014). Variation in amino acid content and its relationship to nitrogen content and growth rate in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *Journal of phycology*, 50(1), 216-226.
5. APROMAR. (2015). Evaluación del estado de explotación y propuestas de gestión sostenible y cultivo de macroalgas en Andalucía, Asturias y Galicia. APROMAR
6. Barr, N. G. (2007). Aspects of nitrogen metabolism in the green algae *Ulva*: developing an indicator of seawater nitrogen loading (Doctoral dissertation, University Auckland).

7. Ben-Ari, T., Neori, A., Ben-Ezra, D., Shauli, L., Odintsov, V., & Shpigel, M. (2014). Management of *Ulva lactuca* as a biofilter of mariculture effluents in IMTA system. *Aquaculture*, 434, 493-498.
8. Cohen, I., & Neori, A. (1991). *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. I. Ammonia uptake kinetics and nitrogen content. *Botanica Marina*, 34(6), 475-482.
9. Corral, M., Grizel, H., Montes, J., & Polanco, E. (2000). La acuicultura. *Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias, y estrategia comercial Fundación Alonso Martín Escudero*.
10. de Rojas, D. S. (2012). Legislación Española y Comunitaria, publicada en el BOE, y en el DOUE de Octubre a Diciembre de 2011 y Enero 2012. *Afinidad*, 68(557).
11. Duke, C. S., Lapointe, B. E., & Ramus, J. (1986). Effects of light on growth, RuBCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta) 1. *Journal of phycology*, 22(3), 362-370.
12. Jiménez Del Rio, M., Ramazanov, Z., & Garcia-Reina, G. (1996). *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. In *Fifteenth International Seaweed Symposium* (pp. 61-66). Springer Netherlands.
13. Klimaitis, N. Influencia de les condicions de cultiu en les taxes d'eliminació de N i P del la macroalga *Ulva ohnoi*. Treball final de grau, UPC, ESAB, En procés d'avaluació.
14. Mata, L., Magnusson, M., Paul, N. A., & de Nys, R. (2016). The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 365-375.



15. McHugh, D. J. (2002). Prospects for seaweed production in developing countries. FAO Fisheries Technical Circular. No.968. Rome, FAO. 28pp.
16. Msuya, F. E., & Neori, A. (2008). Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*, 20(6), 1021-1031.
17. Msuya, F. E., & Neori, A. (2010). The performance of spray-irrigated *Ulva lactuca* (Ulvophyceae, chlorophyta) as a crop and as a biofilter of fishpond effluents. *Journal of phycology*, 46(4), 813-817.
18. Naldi, M., & Wheeler, P. A. (1999). Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *Journal of Phycology*, 35(1), 70-77.
19. Pereira, R., Yarish, C., & Sousa-Pinto, I. (2006). The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 252(1), 66-78.
20. Pinchetti, J. L. G., del Campo Fernández, E., Díez, P. M., & Reina, G. G. (1998). Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 10(4), 383-389.
21. Soto, D. (2009). *Integrated mariculture: a global review* (No. 529). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
22. Soto, D. (2009). *Integrated mariculture: a global review* (No. 529). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

23. Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanzpour, Z., & Waaland, J. R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2500-2506.
24. Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A. H., Kautsky, N., & Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*, 226(1), 69-90.
25. Villares, R., Puente, X., & Carballeira, A. (1999). Nitrogen and phosphorus in *Ulva sp.* in the Galician Rias Bajas (northwest Spain): seasonal fluctuations and influence on growth. *BOLETIN-INSTITUTO ESPANOL DE OCEANOGRAFIA*, 15(1/4), 337-342.
26. Winberg, P. C., Ghosh, D., & Tapsell, L. (2009). Seaweed Culture in Integrated Multi-Trophic Aquaculture-Nutritional Benefits and Systems for Australia. Rural Industries research and development corporation Publication N°09/005.



7 Annex

A continuació figuren els resultats de totes les anàlisis realitzats en aquest treball en forma de taules. S0, S1, S2.... representen les setmanes dels experiments i R1, R2 i R3 representen els 3 tancs amb les diferents densitats de cultiu de 0.8 Kg/m², 1 Kg/m² i 1.2 Kg/m² respectivament.

	%MS		
	R1	R2	R3
S0	10,97		
S1	11,02	11,86	11,01
S2	11,13	12,17	13,20
S3	10,84	10,84	11,02
S4	10,25	10,70	11,54
S5	9,77	9,97	10,51
S6	10,03	10,50	10,99
S7	10,75	10,49	10,25

%MS= percentatge de matèria seca.

	%MM sms				%MM smh		
	R1	R2	R3		R1	R2	R3
S0	20,77 ± 0,23			S0	2,077 ± 0,023		
S1	21,57 ± 0,17	21,96 ± 0,45	21,43 ± 1,06	S1	2,377 ± 0,019	2,604 ± 0,054	2,359 ± 0,117
S2	24,24 ± 0,85	25,27 ± 0,73	23,90 ± 0,31	S2	2,697 ± 0,094	3,075 ± 0,089	3,155 ± 0,041
S3	31,19 ± 1,16	27,41 ± 0,97	25,34 ± 0,41	S3	3,381 ± 0,125	2,972 ± 0,106	2,792 ± 0,045
S4	25,86 ± 0,35	22,7 ± 0,14	21,69 ± 0,25	S4	2,651 ± 0,036	2,429 ± 0,015	2,503 ± 0,028
S5	25,97 ± 0,32	24,83 ± 0,12	24,08 ± 0,04	S5	2,537 ± 0,031	2,475 ± 0,012	2,530 ± 0,004
S6	23,27 ± 0,08	26,41 ± 0,79	27,27 ± 0,65	S6	2,334 ± 0,008	2,773 ± 0,083	2,997 ± 0,072
S7	23,69 ± 0,20	23,78 ± 0,17	23,36 ± 0,26	S7	2,546 ± 0,021	2,494 ± 0,018	2,395 ± 0,027

%MM= percentatge de matèria mineral sobre mostra seca i sobre mostra humida.

	mg P / 100 g sms				mg P / 100 g smh		
	R1	R2	R3		R1	R2	R3
S0	216,1 ± 6,3			S0	21,61 ± 0,63		
S1	277,9 ± 4,9	273,7 ± 2,8	289,7 ± 3,5	S1	30,57 ± 0,54	32,46 ± 0,34	31,87 ± 0,38
S2	286,4 ± 2,1	285,0 ± 5,9	308,9 ± 8,2	S2	31,88 ± 0,24	34,69 ± 0,71	40,78 ± 1,09
S3	290,4 ± 11,2	311,5 ± 4,8	302,3 ± 3,8	S3	31,48 ± 1,21	33,77 ± 0,52	33,32 ± 0,42
S4	335,8 ± 2,0	345,2 ± 8,9	318,8 ± 5,5	S4	34,42 ± 0,20	36,93 ± 0,96	36,79 ± 0,63
S5	300,4 ± 3,2	281,0 ± 7,0	290,2 ± 17,7	S5	29,35 ± 0,31	28,02 ± 0,70	30,50 ± 1,86
S6	315,7 ± 2,3	314,8 ± 1,6	288,8 ± 2,6	S6	31,66 ± 0,23	33,06 ± 0,16	31,74 ± 0,28
S7	444,3 ± 4,0	420,3 ± 4,4	425,1 ± 16,8	S7	47,76 ± 0,43	44,09 ± 0,46	43,57 ± 1,72

mg de fòsfor en 100 g sobre mostra seca i sobre mostra humida.

% N org sms				% N org smh			
	R1	R2	R3		R1	R2	R3
S0	3,14 ± 0,07			S0	0,314 ± 0,007		
S1	3,52 ± 0,08	3,54 ± 0,12	3,53 ± 0,06	S1	0,388 ± 0,009	0,420 ± 0,014	0,389 ± 0,006
S2	3,49 ± 0,04	3,56 ± 0,03	3,76 ± 0,02	S2	0,388 ± 0,004	0,433 ± 0,004	0,497 ± 0,002
S3	3,38 ± 0,04	3,46 ± 0,10	3,75 ± 0,14	S3	0,367 ± 0,004	0,375 ± 0,011	0,413 ± 0,015
S4	3,38 ± 0,16	3,59 ± 0,04	4,00 ± 0,17	S4	0,346 ± 0,016	0,384 ± 0,004	0,461 ± 0,020
S5	3,30 ± 0,07	3,55 ± 0,17	3,60 ± 0,12	S5	0,322 ± 0,006	0,354 ± 0,017	0,378 ± 0,013
S6	3,62 ± 0,07	3,63 ± 0,08	3,41 ± 0,14	S6	0,364 ± 0,007	0,381 ± 0,008	0,409 ± 0,017
S7	3,98 ± 0,18	4,12 ± 0,09	4,34 ± 0,15	S7	0,428 ± 0,019	0,432 ± 0,009	0,445 ± 0,015

Percentatge de nitrogen orgànic sobre mostra seca i sobre mostra humida.

% N-NO ₃ sms				% N-NO ₃ smh			
	R1	R2	R3		R1	R2	R3
S0	0,095 ± 0,005			S0	0,0095 ± 0,0005		
S1	0,237 ± 0,019	0,236 ± 0,014	0,308 ± 0,023	S1	0,0262 ± 0,0021	0,0280 ± 0,0017	0,0339 ± 0,0025
S2	0,209 ± 0,011	0,182 ± 0,006	0,204 ± 0,006	S2	0,0232 ± 0,0012	0,0222 ± 0,0007	0,0269 ± 0,0009
S3		0,199 ± 0,004		S3		0,0215	
S4	0,149 ± 0,007	0,095 ± 0,006	0,155 ± 0,005	S4	0,0153 ± 0,0007	0,0102 ± 0,0007	0,0179 ± 0,0005
S5	0,141 ± 0,012	0,150 ± 0,005	0,286 ± 0,015	S5	0,0138 ± 0,0011	0,0149 ± 0,0005	0,0301 ± 0,0016
S6		0,148 ± 0,002		S6		0,0156	
S7	0,176 ± 0,011	0,138 ± 0,008	0,124 ± 0,002	S7	0,0190 ± 0,0012	0,0145 ± 0,0008	0,0127 ± 0,0002

Percentatge de nitrogen nítric sobre mostra seca i sobre mostra humida.

% N total sms				% N total smh			
	0,8 Kg/m ²	1 Kg/m ²	1,2 Kg/m ²		R1	R2	R3
S0	3,24 ± 0,075	3,24 ± 0,075	3,24 ± 0,075	S0	0,32	0,32	0,32
S1	3,76 ± 0,099	3,78 ± 0,134	3,84 ± 0,083	S1	0,42	0,45	0,42
S2	3,70 ± 0,051	3,74 ± 0,036	3,96 ± 0,026	S2	0,41	0,45	0,53
S3		3,66 ± 0,104		S3	0,37	0,48	0,41
S4	3,53 ± 0,167	3,69 ± 0,046	4,16 ± 0,175	S4	0,37	0,39	0,48
S5	3,44 ± 0,082	3,70 ± 0,175	3,89 ± 0,135	S5	0,33	0,37	0,41
S6		3,78 ± 0,082		S6	0,36	0,43	0,41
S7	4,13 ± 0,191	4,26 ± 0,098	4,46 ± 0,152	S7	0,45	0,45	0,46

Percentatge de nitrogen total sobre mostra seca i sobre mostra humida.

% Proteïna sms				% Proteïna smh			
	0,8 Kg/m ²	1 Kg/m ²	1,2 Kg/m ²		R1	R2	R3
S0	19,63 ± 0,438	19,625 ± 0,438	19,625 ± 0,438	S0	1,96	1,96	1,96
S1	22,00 ± 0,500	22,13 ± 0,750	22,06 ± 0,375	S1	2,43	2,63	2,43
S2	21,81 ± 0,250	22,25 ± 0,188	23,50 ± 0,125	S2	2,43	2,71	3,11
S3	21,13 ± 0,250	21,63 ± 0,625	23,44 ± 0,875	S3	2,29	2,34	2,58
S4	21,123 ± 1,000	22,44 ± 0,250	25,00 ± 1,063	S4	2,16	2,40	2,88
S5	20,63 ± 0,438	22,19 ± 1,063	22,50 ± 0,750	S5	2,01	2,21	2,36
S6	22,63 ± 0,438	22,69 ± 0,500	21,31 ± 0,875	S6	2,28	2,38	2,56
S7	24,88 ± 1,125	25,75 ± 0,563	27,13 ± 0,938	S7	2,68	2,70	2,78

Percentatge de proteïna sobre mostra seca i sobre mostra humida.